

Fosfaattien ja vetyfosfonaattien suojaryhmät

Zehong Liang

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Kemian ja molekyylitieteiden
maisteriohjelma

Maaliskuu 2020



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme Kemian ja molekyyli-tieteiden maisteriohjelma	
Tekijä – Författare – Author Zehong Liang			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Fosfaattien ja vetyfosfonaattien suojaryhmät			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track Orgaaninen kemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Maisterintutkielma		Aika – Datum – Month and year Maaliskuu 2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 62
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Tämä tutkimus on osa DNA-oligonukleotidien liuosynteesin menetelmien kehittämishanketta. Kemiallinen oligonukleotidisynteesi tehdään tyypillisesti kiinteän kantajan päällä. Suurempien ainemäärien valmistamiseksi liuosfaasisissa toimiva menetelmä olisi kuitenkin toivottava.</p> <p>Vaiheittain etenevässä synteesimenetelmässä on keskeistä löytää yhteensopiva sarja suojaryhmiä. Kiintokantaja- ja liuosfaasisynteesissä suojaryhmiltä vaaditaan erilaisia ominaisuuksia, koska reaktiot suoritetaan eri tavalla. Liuosfaasisynteesissä reaktioiden tasapaino pitää asettua vahvasti tuotteiden puolelle, koska toisin kuin kiintokantajamenetelmässä sivutuotteita ei voi huuhtoa pois ja reagenssien määrää ei voida pitää niin vakaana. Olemme kehittäneet sarjan suojaryhmäreagensseja nukleosidien 5'-hydroksyyli suojaryhmän suojaamiseksi asetaalina. Asetaalisuoja voidaan liuosynteesissä poistaa kokonaan ja suojaryhmällä on tarkoitus korvata samaan ortogonaaliseen ryhmään kuuluva trityylisuojaus, joka ei soveltunut liuosfaasisynteesiin. Nyt esiteltävässä työssä paneudutaan menetelmään soveluttuvien 2'-deoksirukleosidi 3'-O-vetyfosfonaattiestereiden valmistamiseen.</p> <p>Fosfori(V)-yhdisteiden reaktiivisuus ei useinkaan ole riittävä fosfaattiryhmän liittämiseen kohdemolekyyliin olevaan hydroksyyli-ryhmään, joten fosforyloinnissa käytetään usein fosfori(III)-yhdisteitä, kuten fosfiitteja, fosforamidiitteja ja vetyfosfonaatteja. Liitettävä fosfaattiryhmä, kuten monet muut reaktiiviset funktionaaliset ryhmät, suojataan usein suojaryhmillä. Suojaryhmillä voidaan niiden päättarkoituksen lisäksi muokata molekyylin rakennetta ja fysikokemiallisia ominaisuuksia. Reaktiotuotteen liukoisuutta voidaan muokata suojaryhmillä sen eristyksen tai jatkoreaktioiden helpottamiseksi. Tutkielman kirjallisuusosassa tarkastellaan suojaryhmiä, joita on käytetty fosfaateille ja vetyfosfonaateille. Fosfaattisuojausryhmällä voidaan mahdollisesti suojata vetyfosfonaattimonooesteri diesteriksi, jolloin negatiivinen varaus saadaan naamioitua ja tuotteesta tulisi lipofiilisempi.</p> <p>Kokeellisen tutkimuksen tavoite oli valmistaa 5'-asetaalisuojattuja tymidiinin vetyfosfonaatteja difenyyli-vetyfosfonaattireagenssilla. Saanto jäi hyvin pieneksi, koska tuote osoittautui liian vesiliukoiseksi pienikokoisen ja heikosti lipofiilisen asetaalisuojan kanssa. Ratkaisuksi kehitettiin menetelmä, jossa muodostettiin ensin tymidiinin vetyfosfonaattidiesteri syanoetanolin kanssa. Vetyfosfonaattidiesteri on todennäköisesti varauksettomana tuotteena ja lisätyn alkyyli-ryhmän kanssa poolittomampi. Suojaryhmän avulla tymidiinin vetyfosfonaatti voitaisiin eristää, jonka jälkeen ryhmä poistetaan emäksellä β-eliminaatioreaktiossa. Vetyfosfonaattidiesterin eristäminen ja suojaryhmän poistaminen vedettömissä olosuhteissa helpottaa vetyfosfonaattimonooesterin talteenottoa. Vaihtoehtoisesti tymidiinin liukoisuusominaisuuksia muokattiin suojaamalla tymidiinin 4-O β-eliminoituvalla poolittomalla suojaryhmällä. Fosfitylointimenetelmä ei tarvitsisi muokkausta jos, emäsmuokattu tymidiini osoittautuu veteen liukenemattomaksi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords fosfaatti, vetyfosfonaatti, suojaryhmä, oligonukleotidi			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Petri Heinonen ja Mikko Oivanen			
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited HELDA - Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto / HELDA - Helsingfors universitets digitala publikationsarkiv / HELDA - Digital Repository of the University of Helsinki			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

Lyhenneluettelo	1
Kirjallisuuskatsaus	3
1. Johdanto	3
2. Alkyyli suojarahmät	4
2.1 Metyyli ryhmä	4
2.2 2,2,2-Trihalogeeni etyyli ryhmä	7
2.3 Alkyyli ryhmä	9
2.4 Bentsyyli ryhmä	12
2.5 2-(Trialkyylisilyyli) etyyli ryhmä	13
3. Fenyyli suojarahmät	14
3.1 Fenyyli ryhmä	14
3.2 Fosfaatin suojaaminen <i>S</i> -fenyyli fosforotioaattina	18
4. β -Eliminoituvat suojarahmät	20
4.1 β -Syano etyyli ryhmä	22
4.2 <i>Para</i> -nitrofen etyyli ryhmä	24
4.3 Fluorenyylim etyyli ryhmä	25
4.4 1,3-Ditia-2-yyli metyyli johdannaiset (Dim)	26
5. Fotolabiilit suojarahmät	28
5.1 Bentsyyli ryhmät	28
5.2 <i>orto</i> -nitrobentsyyli ryhmä	31
5.3 Bentsoiini	33
5.4 Fenasyylisuojarahmät	34
5.5 Heterosykliset kromoforit	38
6. Syklisaatiolla irtoavat suojarahmät	41

6.1 <i>N</i> -Trifluoroasettyyliaminoalkyyliiryhmä	41
6.2 2-(Aryylikarbamoyylioksi)etyyliiryhmä	43
6.3 2-Amidietyyliiryhmä	43
6.4 4-Oksopentyyliiryhmä	44
6.5 3-(<i>N</i> - <i>tert</i> -butyylikarboksiamidi)-1-propyyliiryhmä	44
6.6 Syklisoituvat pyridyylisuojarahmät	45
6.7 Metyylitioalkyyliiryhmä	45
7. Yhteenveto	46
Kokeellinen osuus	47
8. Johdanto	47
9. Tulokset ja tulosten tarkastelu	49
9.1 5'- <i>O</i> -alkoksi-isopropyyliisuojarahun tymidiinin fosfitylointi difenyylivetyfosfonaatilla (DPHP)	49
9.2 5'- <i>O</i> -metoksi-isopropyyliisuojarahun 3'- <i>O</i> -vetyfosfonaatin 80 valmistaminen suojaamalla vetyfosfonaatti syanoetanolilla.	50
9.3 Tymidiinin vesiliukoisuuden heikentäminen lipofiilisella suojarahmällä	51
10. Menetelmät	52
10.1 Tymidiinin 3'-vetyfosfonaattimonoesterin valmistaminen	52
5'- <i>O</i> -isopropoksi-isopropyyliisuojarahun 3'-vetyfosfonaattimonoesteri 74	52
5'- <i>O</i> -dimetoksitriityliisuojarahun 3'-vetyfosfonaattimonoesteri 77	53
5'- <i>O</i> -sykloheksoksi-isopropyyliisuojarahun 3'-vetyfosfonaattimonoesteri 75	53
5'- <i>O</i> -metoksi-isopropyyliisuojarahun 3'-syanoetyylivetyfosfonaattidiesteri 79	54
5'- <i>O</i> -metoksi-isopropyyliisuojarahun 3'-vetyfosfonaatti 80	55
10.2 Tymidiinin 4- <i>O</i> suojaaminen β -eliminoituvalla suojarahmällä	55
3',5'- <i>O</i> -Bis- <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-4- <i>O</i> -(2,4,6-tri-isopropyyli- <i>phenylsulfon</i> yyli)tymidiini 82	55

3',5'- <i>O</i> -Bis- <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-4- <i>O</i> -(2-syanoetyyli)-tymidiini 83	56
3',5'- <i>O</i> -Bis- <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-4- <i>O</i> -(4-nitrofenetyyli)-tymidiini 84	56
3',5'- <i>O</i> -Bis- <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-4- <i>O</i> -(fluorenyylimetyyli)-tymidiini 85.....	57
Lähdeluettelo	58

Lyhenneluettelo

AcOH	Etikkahappo
All	Allyyliryhmä
Alloc	Allyylioksikarbonyyliryhmä
B	Emäs
BSA	<i>Bis</i> -(trimetyylisilyyli)asetamidi
cAMP	Syklinen adensiinimonofosfaatti
cGMP	Syklinen guansiinimonofosfaatti
CNE	Syanoetyyliryhmä
Cp	Syklopentadienyyli
CYP	2-Sykloheksoksi-2-propyyliiryhmä
DBN	1,5-Diatsabisyklo[4.3.0]non-5-eeni
DBU	1,8-Diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni
DCM	Dikloorimetaani
Dim	1,3-Ditia-2-yyliiryhmä
DIPEA	Di-isopropylietyyliamiini
DMAP	4-Dimetyyliaminopyridiini
DMF	Dimetyyliformamidi
Dmoc	1,3-Ditia-2-yyliimetoksikarbonyyliryhmä
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DMTr	Dimetoksitrityyli
DPHP	Difenyylivetyfosfonaatti
EtOAc	Etyyliasetatti

EWG	Elektroneja puoleensa vetävä ryhmä
Fm	Fluorenyylimetyyli
HMPA	Heksametyylifosforiamidi
IPP	2-Isopropoksi-2-propyyliiryhmä
kat.	Katalyytti
MIP	2-Metoksi-2-propyyliiryhmä
n-hex	n-Heksaani
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
Nu	Nukleofiili
PNE	<i>Para</i> -nitrofenetyyliiryhmä
Pyr	Pyridiini
RT	Huoneenlämpö
TBAF	Tetrabuttyliammoniumfluoridi
TBS	<i>tert</i> -Buttylidimetyylisilyyliiryhmä
TEA	Trietyyliamiini
TEAH ⁺	Trietyyliammoniumioni
THF	Tetrahydrofuraani
TIPSCl	2,4,6-Tri-isopropyylifenyylisulfonylikloridi
TLC	Ohutkerroskromatografia
TMG	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyyliguanidiini
TMS	Trimetyylisilyyliiryhmä
TMSCl	Trimetyylisilyylikloridi
TMSI	Trimetyylisilyylijodidi

Kirjallisuuskatsaus

1. Johdanto

Fosfaatit ovat fosforihapon johdannaisia ja ne voivat muodostaa enintään kolme esterisidosta alkoholien kanssa. Fosfaattiryhmillä on monta roolia eliöiden homeostasian ylläpidossa ja ryhmää esiintyykin monenlaisien biomolekyylien kanssa. Esimerkiksi proteiineissa, hiilihydraateissa, lipideissa ja nukleiinihapoissa esiintyy fosfaattiryhmiä.

Monien bioaktiivisten molekyylien rakenteessa on fosfaattiryhmiä ja kyseisiä molekyyliä valmistetaan tutkimuskäyttöön. Reaktiota, jossa molekyyliin tuodaan fosfaattiryhmä, kutsutaan fosforyloinniksi. Fosfori(V)-yhdisteiden reaktiivisuus ei useinkaan ole riittävä fosfaattiryhmän liittämiseen kohdemolekyyliin olevaan hydroksyyliin, joten fosforyloinnissa käytetään usein fosfori(III)-yhdisteitä. Fosfori(III)-yhdisteitä ovat esimerkiksi fosfiitit, fosforamidiitit ja vetyfosfonaatit. Reaktiivisemmalla fosforyl-yhdisteellä ensin fosfityloidaan molekyyli, jonka jälkeen juuri liitetty funktionaalinen ryhmä hapetetaan fosfaatiksi.

Lisätty fosfaattiryhmä, kuten monet muut reaktiiviset funktionaaliset ryhmät, suojataan usein suojaryhmillä. Suojaryhmät estävät rakennettavan molekyylin funktionaalisuuksia ei-toivotuilta reaktioilta synteessin välivaiheissa. Synteesireittiä suunniteltaessa suojaryhmiä pitäisi pyrkiä käyttämään mahdollisimman vähän, sillä suojaryhmän lisääminen ja poistaminen tuo vähintään kaksi vaihetta lisää.

Suojaryhmillä voidaan niiden päätarkoituksen lisäksi muokata molekyylin rakennetta ja fysikokemiallisia ominaisuuksia. Reaktiotuotteen liukoisuutta voidaan muokata suojaryhmillä sen eristyksen tai jatkoreaktioiden helpottamiseksi. Fosfaattiryhmän kohdalla esterisidosten määrä vaikuttaa molekyylin ominaisuuksiin, koska fosfaattimonoesterissä ja -diesterissä on negatiivinen varaus.

Oligonukleotidisynteesissä käytetään useita erilaisia suojaryhmiä nukleotidien hydroksyyliin, emäsien ja muodostuvan fosfaatin suojaamisessa. Tietty suojaryhmä ovat vakiinnuttaneet paikkansa valmistusmenetelmässä, jossa toistetaan samoja reaktioita monta kertaa pitkän ketjun valmistamiseksi. Nukleotidien 5'-hydroksyyliin suojaamiseen käytetään yleisimmin triyylisuoja-ryhmiä. Triyylisuoja-ryhmän käyttö kiintokantajasynteesissä on ongelmaton, mutta liuossynteesissä suojaryhmän poistaminen ei ole täydellistä.

Olemme kehittäneet liuossynteesiä varten 2-alkoksiPROPANYYLIRYHMÄN¹, joka on asetaalisuojaryhmä. Suojaryhmä kuuluu samaan ortogonaaliseen ryhmään trityylisuojausten kanssa ja liuossynteesissä ryhmä voidaan poistaa kokonaan. Suojaryhmän käytössä ilmenee liukoisuushaasteita nukleotidimonomeerin synteesissä vetyfosfonaattimenetelmällä. Tymiiniä, jota käytetään testiyhdisteenä, ei voida eristää 3'-*O*-vetyfosfonaattimonoesterinä orgaaniseen faasiin, kun käytetään asetaalisuojaa 5'-hydroksyyliRYHMÄSSÄ.

Tutkielman kirjallisuusosassa selvitetään suojaryhmiä, joita on käytetty fosfaateille ja vetyfosfonaateille. Fosfaattisuojaryhmiä voidaan mahdollisesti käyttää vetyfosfonaateissa. Suojaamalla vetyfosfonaattimonoesteri diesteriksi voidaan naamioda negatiivinen varaus ja tehdä tuotteesta lipofiilisempi. Vetyfosfonaattidiesteri pitää eristää ja suojaryhmä poistaa vedettömissä olosuhteissa, jotta vetyfosfonaattimonoesteri saadaan talteen.

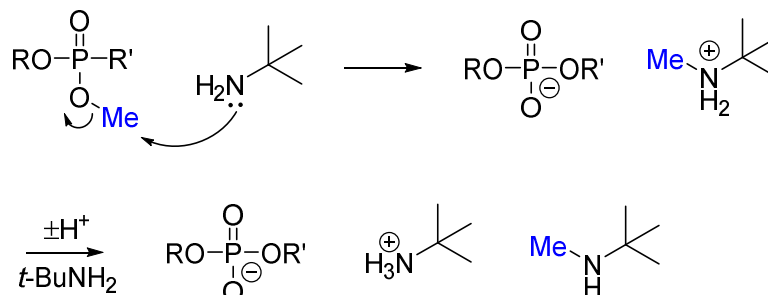
2. AlkyyliSUOJARYHMÄT

2.1 Metyyliryhmä

Metyyliryhmää on käytetty suojaryhmänä fosfotriesterimenetelmällä tehtävässä oligonukleotidisynteesissä. Fosfotriesterimenetelmä on jäänyt uudempien menetelmien myötä varsin vähäiselle käytölle. Myöskään metyyliRYHMÄ fosfaattisuojaryhmänä ei ole enää juurikaan käytössä. Metyyliryhmä ei ole kovin stabiili happamille olosuhteille, joita käytetään yleisimpien happolabiilien 5'-hydroksyyliSUOJAUSTEN poistoon.² Metyyliryhmän irtoaminen fosfotriesteristä vaatii kuitenkin useamman päivän reaktion TEA:ssa, morfoliinissa, pyridiinissä tai metanolia sisältävässä ammoniakivesiliuoksessa.³

Happo- ja emäskatalysoidun hydrolyysin lisäksi metyyliRYHMÄ voidaan irrottaa nukleofiileillä fosfaateista ja fosfonaateista. Nukleofiilinen substituutio on mahdollista, koska fosfaatit ja fosfonaatit ovat hyviä lähteviä ryhmiä niiden happamuuden vuoksi. Nukleofiili hyökkää metyyliRYHMÄÄN ja fosfaatti tai fosfonaatti toimii lähtevänä ryhmänä. Demetylointiin voidaan käyttää amiineja. Primääriset amiinit ovat reaktiivisempia, kuin sekundääriset tai tertiääriset.⁴ Primäärisistä amiineista *tert*-butyyliamiini on käytetyin, koska se on riittävän nukleofiilinen ja helposti haihdutettavissa. *tert*-Butyyliamiinilla voi demetyloidä pelkästään fosfotriestereitä tai fosfonaattidiestereitä. Demetyloitu fosfaatti tai fosfonaatti on anioni, joka muodostaa ioniparin *tert*-butyyliammoniumin kanssa, eikä reaktiossa muodostuneen *tert*-

butyyli-metyyliammoniumin kanssa.⁵ Suolan muodostus myös pysäyttää reaktion niin, että vaikka rakenteessa olisi useampi metyyli-ryhmä, vain yksi niistä demetyloituu.^{4,5} Demetylointi *tert*-butyyliamiinilla esitetään kaaviossa 1.



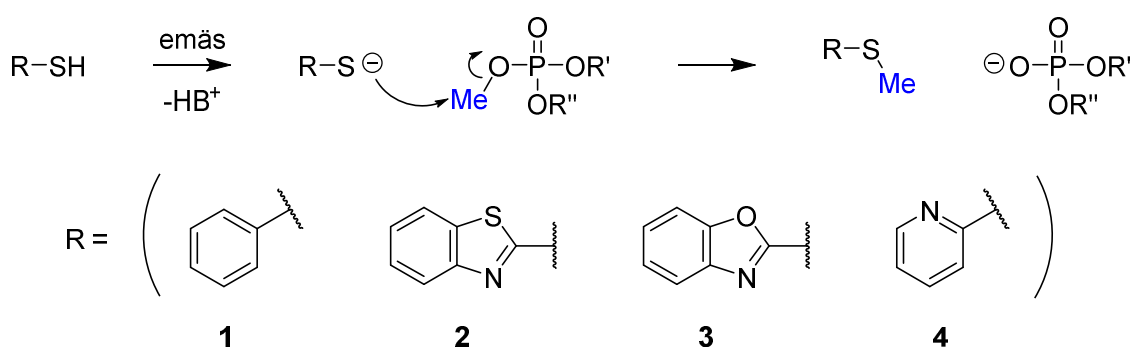
Kaavio 1. Fosfotriesterin tai fosfonaattidiesterin demetylointi *tert*-butyyliamiinilla. Demetyloinnissa muodostuu *tert*-butyyli-metyyliammoniumia, joka luovuttaa protoninsa *tert*-butyyliamiinille. *tert*-Butyyliammonium muodostaa fosfaatin tai fosfonaatin kanssa inertin ioniparin. Kaaviossa R' on OR tai H.

Nukleotidifosfotriesteri voidaan demetyloidä liuottamalla se *tert*-butyyliamiiniin. Reaktio voi kestää monta päivää huoneenlämmössä, joten sitä voidaan nopeuttaa refluksioimalla. Reaktiolämpötila pysyy kuitenkin maltillisena, koska *tert*-butyyliamiinin kiehumispiste on 46 °C. Demetylointi on mahdollista tehdä dioksaanissa, DCM:ssä, bentseenissä ja metanolissa^{6,7}, mutta silloinkin joudutaan käyttämään suhteellisen suuri ylimäärä *tert*-butyyliamiinia.⁴ Reaktioajat ovat yleisesti pitkiä. Tymiini-nitrimeerin demetyloinnin on raportoitu kestävän 15 tuntia ja pidempien oligonukleotidien kohdalla suojauksen poiston reaktioaika kasvaa ketjun pidentyessä.^{2,8,9}

Metyyliä pidempiä alkyyliryhmiä ei voida dealkyloidä refluksioimalla normaalissa ilmanpaineessa. Dialkyylivetyfosfonaatteja voidaan kuitenkin monodealkyloidä *tert*-butyyliamiinilla lämmittämällä suljetussa reaktioastiassa. Dimetyylivetyfosfonaatin monodemetylointi voidaan tehdä kolmessa tunnissa paineastiassa 60 °C lämpötilassa. Alkyyliryhmän pituuden kasvaessa lämpötilaa pitää nostaa ja reaktioaika pitenee. Isopropyyli ja *n*-butyyli dealkyloivat yhtä vaikeasti ja reaktio vaatii lämmittämistä 95 °C:een paineastiassa yön yli.⁵

Metyyliryhmä voidaan poistaa nukleofiilisellä substituutilla myös tiolaateilla. Toisin kuin amiinit, tiolaatit voivat demetyloidä fosfaatin mono- ja diestereitä.¹⁰ Ensimmäisiä nukleosidifosfotriesterin demetylointeja tiolaatilla tehtiin litiumtiofenoksidilla

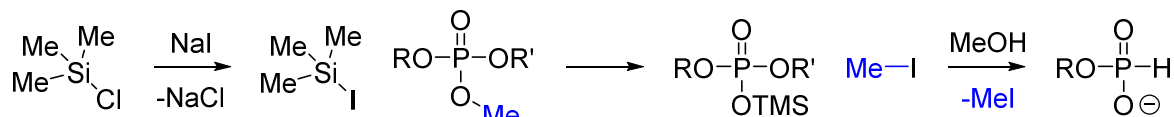
huoneenlämmössä THF-HMPA-liuotuksessa ja puolen tunnin reaktioaika oli riittävä.³ Reaktio on huomattavasti nopeampi, kuin *tert*-butyyliamiinilla. Tiofenolit **1** ovat fenoleja happamampia, joten niiden deprotonointi suhteellisen vahvalla emäksellä on lähes täydellinen.³ Demetylointiin voidaankin käyttää tiofenolia **1** trietyyliamiini-dioksaaniliuoksessa. Reaktioaika jää suhteellisen lyhyeksi ja suojaus saadaan poistettua tunnissa huoneenlämpötilassa.^{3,6,7,11} Dinukleosidifosfotriesterin demetylointi tiofenoli-TEA-dioksaanilla huoneenlämmössä vie yhden tunnin.^{3,11} TEA:n sijasta voidaan käyttää myös morfoliinia emäksenä.³ Metyylisuojausten poistossa jää helposti oligonukleotidiin tiofenolia kontaminaatioksi.⁶



Kaavio 2. Tiolien käyttö fosfotriestereiden demetyloinnissa. Käytetty tioli deprotonoidaan emäksellä, esimerkiksi TEA:lla tai DIPEA:lla. Deprotonoinnista muodostunut tiolaatti toimii nukleofiilina ja hyökkää metyyliryhmään. Käytettyjä tioleita ovat tiofenoli **1**, 2-merkaptobentsotiatsoli **2**, 2-merkaptobentsoksatsoli **3** ja 2-merkaptopyridiini **4**.

2-Merkaptobentsotiatsoli **2** on hajuton vaihtoehto tiofenolille. Demetylointi tehdään *N*-metyylipyrrolidin-2-oniliuoksessa, jossa 2-merkaptobentsotiatsolin ja DIPEA:n konsentraatiot ovat 1,5 M:a. Demetylaatio huoneenlämmössä vaatii pitkän reaktioajan, mutta sitä voidaan lyhentää lämmittämällä reaktioseosta. 2-Merkaptobentsoksatsolia **3** ja 2-merkaptopyridiiniä **4** voidaan myös käyttää demetylointiin, mutta ne ovat vähemmän reaktiivisempia kuin 2-merkaptobentsotiatsoli.¹⁰ Demetylointi tiolaateilla esitetään kaaviossa 2.

Trimetyylisilyylihalideilla voidaan demetyloida fosfaatteja. Demetylointi tehdään TMSCl:lla refluksuimalla kuivassa ACN:ssä. NaI:a lisätään katalyytiksi, koska se muodostaa liuoksessa reaktiivisemmän TMSI:n. Välituotteena muodostuu silyylisuojaattu fosfaatti. Silyyliryhmä irrotetaan metanolilla, jolloin vapautuu demetyloitu fosfaatti. Menetelmällä voi myös dealkyloida lyhyitä alkyyliyhmiä. Demetyloinnin vaiheet esitetään kaaviossa 3.¹²

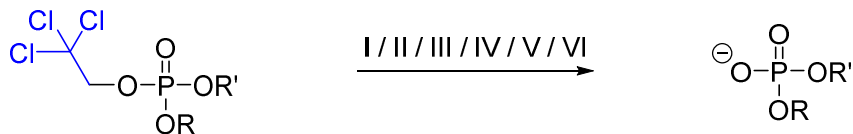


Kaavio 3. Fosfaattien demetylointi trimetyylisilyylihalideilla. Välituotteena muodostuu silyloitu fosfaatti. Silyyliryhmä irrotetaan metanolilla.

2.2 2,2,2-Trihalogeenietyyliryhmä

2,2,2-Trikloorietyyli on fosfaattisuojarahmä, joka voidaan poistaa selektiivisesti pelkistysreaktiolla. 2,2,2-Trikloorietyyliä on käytetty paljon fosfotriesterin suojarahmä, koska se on stabiili happo- ja emäskatalysoidussa hydrolyysissä.¹³ Suojarahmää ei enää käytetä oligonukleotidisyntetiikassa, koska suojarahmän poistovaiheen saannot jäävät huonoiksi pidemmälläkin reaktioajoilla.¹⁴

Suojarahmän poistaminen on tehty ensin sinkkijauheella 4:1 etikkahappo-vesiliuoksessa. Tällä menetelmällä on poistettu 2,2,2-trikloorietyylit ditymidiinifosfaatista ja tritymidiinifosfaatista huoneenlämmössä 20 minuutissa.¹³ Yleisemmin käytössä olleessa menetelmässä voidaan hyödyntää aktivoitua Zn-Cu-reagenssia, joka valmistetaan sinkkirakeista tai -jauheesta ja Cu(II)(OAc)₂-monohydraatista.¹⁵ 2,2,2-Trikloorietyylit poistetaan lisäämällä Zn-Cu-reagenssia DMF:n, johon suojattu fosfaatti on liuotettu.^{14,16} Suojarahmän poistaminen kaikista fosfaateista vaatii seoksen lämmittämistä noin 55 °C:een. Reaktioaika suojarahmän poistamiselle oligonukleotideistä tällä menetelmällä vaihtelee 10 minuutista yhteen päivään.^{2,14,17} DMF:n sijasta liuottimena voidaan käyttää myös 5 % etikkahappoa pyridiinissä.¹⁴ Etikkahappo-pyridiiniliuoksessa voidaan käyttää myös aktivoitua sinkkiä pelkistämisreaktioon.¹⁸ Sinkkijauhetta aktivoidaan väkevällä typpihapolla väkevässä rikkihapossa.¹⁸ Fosfotriesterin vapauttaminen 2,2,2-trikloorietyylisuojarahmästä eri olosuhteissa esitetään kaaviossa 4.

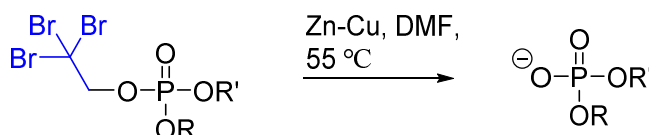


Kaavio 4. 2,2,2-trikloorietyylisuojaus voidaan irrottaa monella tavalla: I) Zn, 4:1 AcOH:H₂O, RT; II) Zn-Cu, DMF, 55 °C; III) Zn-Cu, 1:19 AcOH:Pyr; IV) Zn, 1:19 AcOH:Pyr; V) TBAF, THF, RT; VI) *n*-Bu₃P:DMF:TEA 2:4:1, 80 °C.

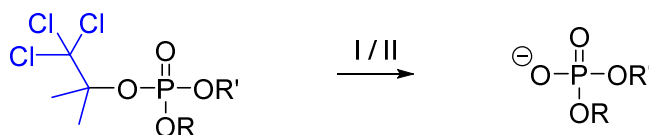
Pelkistysreaktioseos, jossa 2,2,2-trikloorietyyliryhmä irrotetaan, sisältää paljon metalleja ja metalli-ioneja. Metallipartikkelit voidaan suodattaa pois. Tuote pitää puhdistaa hyvin metalli-

ioneista uuttamalla tai ioninvaihtohartsilla, koska mahdolliset metalli-ionijäämät voivat vaikuttaa jatkoreaktioihin.¹⁸ Suojaryhmän irrottamiseen voidaan käyttää myös TBAF:a THF:ssä.¹⁹ Fosfotriesteristä voidaan irrottaa suojaryhmä noin puolessa tunnissa huoneenlämmössä. Fluoridi-ioni hyökkää todennäköisesti fosforiin, joka jatkoreaktiossa hydrolysoituu.

2,2,2-Tribromietyyli irrotetaan samalla tavalla, kuin 2,2,2-trikloorietyyli Zn-Cu-reagenssilla DMF:ssä lämpötilassa 55 °C. Tribromietyyli on kuitenkin labiilimpi pelkistysreaktiossa. Tribromietyyli voidaan irrottaa kahdessa tunnissa dinukleosidi fosfotriesteristä, kun trikloorietyylissä reaktioaika on viisi tuntia. Fosfotriesterin vapauttaminen 2,2,2-tribromietyylisuojarahmasta esitetään kaaviossa 5.^{2,20}



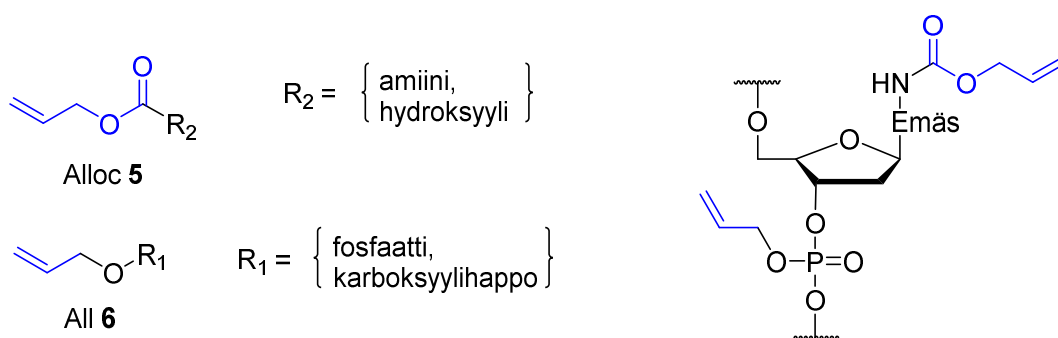
Kaavio 5. 2,2,2-tribromietyylisuojaus irrotetaan fosfotriesteristä Zn-Cu-reagenssilla DMF:ssä 55 °C:ssä. 2,2,2-Trikloori-1,1-dimetyylietyyli on kahden edellisen trihalogeenietyylin tapainen fosfaattisuojarahmä, mutta se on paljon stabiilimpi emäshydrolyysille. Oligotymidyylit voidaan irrottaa kiintokantajasta väkevällä ammoniakkin vesiliuoksella (50 °C) ilman suojaryhmän irtoamista, vaikka reaktioaika olisi 12 tuntia. 2,2,2-Trikloori-1,1-dimetyylietyyli voidaan irrottaa sinkillä 80 % etikkahappoliuoksessa. Suojaryhmä voidaan sinkin lisäksi irrottaa tributyylifosfiinilla. Tributyylifosfiinia sekoitetaan DMF:n ja TEA:n kanssa 2:4:1 suhteessa ja suojaryhmä irtoaa 80 °C:ssä. Reaktioaika on 3 tuntia ja samalla tributyylifosfiiniliuoksella voidaan irrottaa myös 2,2,2-trikloorietyyli. Fosfotriesterin vapauttaminen 2,2,2-trikloori-1,1-dimetyylietyylisuojarahmasta esitetään kaaviossa 6.²¹



Kaavio 6. 2,2,2-trikloori-1,1-dimetyylietyylisuojaus voidaan irrottaa ainakin kahdella tavalla: I) Zn, 4:1 AcOH:H₂O, RT; II) *n*-Bu₃P:DMF:TEA 2:4:1, 80 °C.

2.3 Allyyliryhmä

Allyylisessä asemassa oleva karboksylaatti- tai fosfaattiryhmä voidaan substituoida palladiumkatalyyttisesti nukleofiilillä.²² Tämä on johtanut allyylioksikarbonyylisuojarahmian²³ (Alloc) **5** kehittämiseen amiineille ja hydroksyyliyhmiille sekä allyyliryhmän²⁴ (All) **6** käyttöön karboksyylihapo- ja fosfaattisuojarahmiana.²⁵ Alloc:iä voidaan käyttää nukleiinihappokemiassa amiinien, nukleosidien eksosyklisen amiinien ja sokereiden hydroksyyliyhmiiden suojaamisessa.²³ All:illä suojataan happamempia funktionaalisuuksia, kuten fosfaattiryhmiä ja karboksyylihappoja.²⁵ Kuvassa 1 on esitetty All- ja Alloc-suojarahmit ja niiden käyttökohteet.



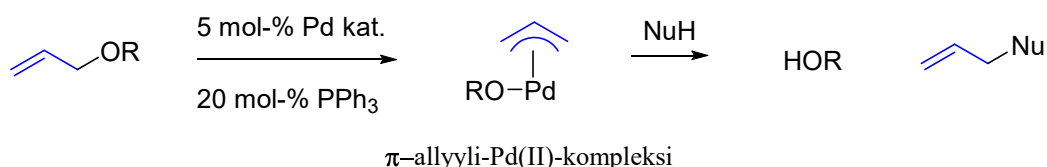
Kuva 1. Funktionaaliset ryhmät, joiden suojaamiseen allyylioksikarbonyyli- (Alloc) **5** ja allyylisuojarahmää (All) **6** yleisimmin käytetään. Kuvan oikealla puolella esitetään All:n ja Alloc:n käyttöä oligonukleotidisynteesissä.

Allyylisuojarahmällä on etuja, joten se on edelleen käytössä. Se on stabiili trityylisuojausten poistoon käytettävissä happamissa reaktio-olosuhteissa ja kestää silyylisuojausten poistoon käytettävän TBAF:n.²⁴ Suojaryhmän poistoon ei tarvita vahvoja emäksiä tai vahvoja nukleofiilejä. Nukleofiili voidaan valita siten, että allyylisuojausten poisto on mahdollista happamissa, emäksisissä tai lähes neutraaleissa olosuhteissa. Koska Alloc **5** ja All **6** kuuluvat suojaryhminä samaan ortogonaaliseen ryhmään, voidaan ne poistaa yhtä aikaa. Tällöin allyyliä voidaan käyttää fosfaattisuojarahmiana ja allyylioksikarbonyyliryhmää esimerkiksi nukleosidien eksosyklisen aminoryhmien suojaamiseen (kuva 1).^{25,26}

Tyypillisesti suojauksen poisto tehdään THF:ssä ja siihen tarvitaan 0,05 ekv. Pd(0)-katalyyttiä, 0,2 ekv. trifenyylifosfiiniligandia ja ylimäärin nukleofiilejä. Palladiumkatalyyttinä tarkoitukseen suosituin on Pd(0)(PPh₃)₄-kompleksi, mutta monia muita Pd(0)- tai Pd(II)-komplekseja voidaan käyttää.^{23,24} Nukleofiileinä voidaan käyttää sekundäärisiä tai primäärisiä amiineja ja muurahais- tai etikkahappoa. Myös amiinin ja muurahaishapon seosta on käytetty.

Yleisimmin käytetään *n*-butyyliamiinia, koska se on poistettavissa reaktioseoksesta haihduttamalla.²⁷

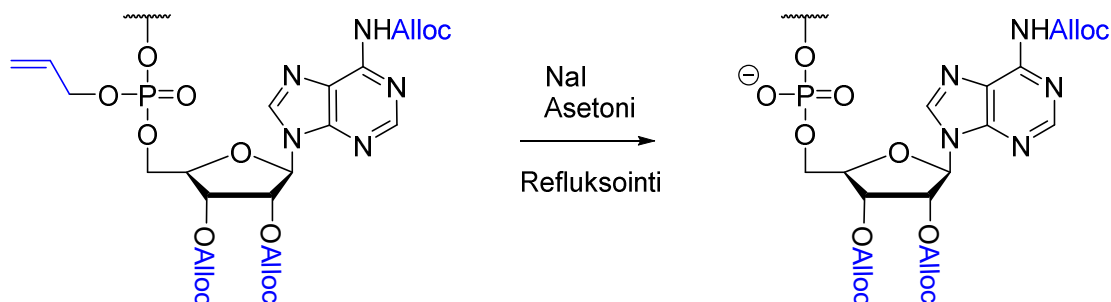
Suojaryhmän irrottaminen tapahtuu π -allyyli-Pd(II)-välivaiheen kautta, joka on esitetty kaaviossa 7. Seokseen lisätty nukleofiili syrjäyttää suojatun funktionaalisuuden. Sivutuotteena muodostuu nukleofiilillä substituoitu allyylinen molekyyli.^{24,28}



Nukleofiili = 1^o tai 2^o amiinit, muurahais- ja etikkahappo

Kaavio 7. All- tai Alloc-ryhmän palladiumkatalyyttinen poistaminen π -allyyli-Pd(II)-kompleksivälivaiheen kautta.

On huomattu, että allyylisuoja ryhmä on mahdollista poistaa myös useilla nukleofiileillä ilman siirtymämetallikatalyyysiä. Pyridiini-vesi-käsittelyllä reaktioaika on 24 tuntia.²⁹ Väkevällä ammoniakkivesiliuoksella (55 °C) allyyliryhmän poistaminen vie kaksi tuntia.³⁰ Ammoniakin vesiliuokseen voidaan myös lisätä 2 % (V/V) merkaptotaetanolia, joka estää fosforotioaattien alkyloinnin, jos valmistetaan oligonukleotidien fosforotioaattimuunnoksia.³⁰ Dimetyyliamiinivesiliuoksessa suojaryhmän poistaminen kestää huoneenlämmössä noin puoli tuntia.³⁰ Tiofenolaatin vesiliuoksessa voidaan poistaa suojaryhmä huoneenlämmössä kymmenessä minuutissa.³⁰ Allyyliryhmää on poistettu NaI:lla vesiliuoksessa ja asetonissa. Vesiliuoksessa NaI irrottaa suurimman osan allyyliryhmistä 20 tunnissa, kun reaktioseosta lämmitetään 55 °C:een.³⁰ NaI:lla suojaryhmän poiston voi tehdä myös refluksimalla asetonissa. Suojaryhmän poisto NaI:lla asetonissa on mielenkiintoinen, koska se on selektiivinen allyylioksikarbonyyliryhmän läsnäollessa (kaavio 8).³¹



Kaavio 8. Allyyliryhmän poistaminen selektiivisesti Alloc:n läsnäollessa.

Allylisuojaryhmä voidaan poistaa palladiumkatalyyttisesti myös sähkökemiallisesti. Katalyysireaktioon tarvitaan PPh_3 -ligandia, mutta reaktiossa ei tarvita nukleofiiliä olleenkaan. $\text{Pd}(0)$ -katalyytti regeneroidaan sähkökemiallisesti. Elektrolyysi voidaan tehdä asetonitrilissä ja reaktioon pitää lisätä elektrolyyttejä.³²

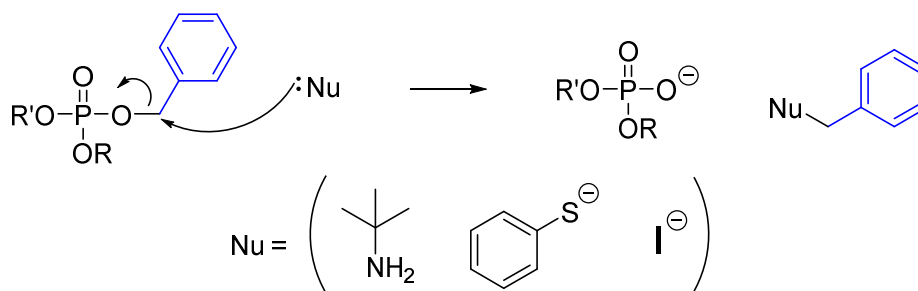
Palladiummetallin lisäksi voidaan käyttää ruteniumia. $\text{CpRu}(\text{II})$ ja 2-kinoliinikarboksyylihapon kompleksia tarvitaan 0,01 ekv. metanolissa. Sekä allyyli- että allyylioksikarbonyyliryhmä voidaan poistaa menetelmällä. Erillisiä nukleofiilejä ei tarvitse lisätä ja sivutuotteena muodostuu haihtuva allyylimetyylieetteri. Jos allyylioksikarbonyylisuojaus poistetaan amiinista, joudutaan lisäämään vahvaa happoa, kuten MeSO_3H :a.³³

Allyylisuojaryhmien käyttö ei ole saanut tulta alleen lääkeaineoligonukleotidien synteesissä. Yksi tutkituimmista oligonukleotidimuunnoksista on fosforotioaatit, jotka ovat resistentimpiä entsyymaattisille hydrolyyseille. Fosforotioaateissa on $\text{P}=\text{S}$ -sidoks, joka voi pienentää palladiumkatalyytin tehoa. Toisaalta raja-arvot lääkkeeksi tarkoitettujen yhdisteiden palladiumjäämille ovat hyvin tiukkoja, joten tuotteiden puhdistukseen jouduttaisiin kiinnittämään erityistä huomiota.³⁰

2.4 Bentsyyliryhmä

Bentsyyli fosfaattisuojarahmānā on niin happolabiili, että se voi irrota poistettaessa 5'-hydroksyyli suojarahmān hapolla.² Happokatalysoitua hydrolyysiä on käytetty bentsyyliryhmān irrottamiseen fosfotriestereistä.³⁴ Fosfodiesterieistä bentsyyliryhmā ei irtoa yhtā helposti.³⁴ Bentsyyliryhmā on myös altis nukleofiilien hyökkäyksille ja tätä on käytetty suojarahmān poistossa.

Bentsyyliryhmān irrotus nukleofiileillä on verrattavissa vastaavaan reaktioon metyyli suojarahmān kanssa. Nukleofiili hyökkää bentsyyliseen hiileen ja fosfaattiryhmā toimii lähtevänä ryhmänä. Yksi bentsyyliryhmā voidaan poistaa fosfotriesteristä refluksimalla 46 °C:ssa *tert*-butyyliamiinin kanssa.^{2,4} Irrotus on mahdollinen myös tiolaattien avulla. Litiumtiofenoksidilla THF/HMPA:ssa debentsylointi kestää alle 30 minuuttia huoneenlämmössä.³ Tiolaattia muodostuu myös tarpeeksi emäksisessä liuoksessa. Käyttämällä liuosta, joka sisältää tiofenolia, TEA:a ja dioksaania, voidaan debentsylointi tehdä tunnissa huoneenlämmössä.³ Jodi-ioni pystyy myös debentsyloimaan fosfotriesterin. Reaktio tehdään asetonitriilissä 80 °C:ssa.³⁵ Kaaviossa 9 esitetään fosfotriesterien debentsylointi nukleofiileillä.

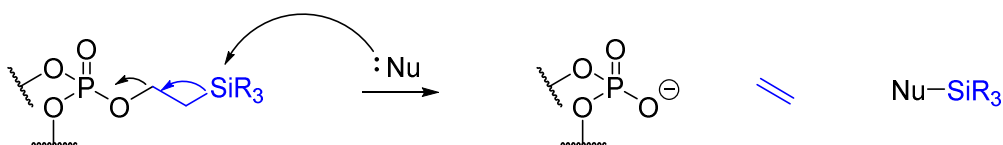


Kaavio 9. Fosfotriesterin debentsylointi nukleofiileillä. Nukleofiileinä voivat toimia *tert*-butyyliamiini, tiofenolaatti ja jodi-ioni.

Bentsyyliryhmān voi poistaa myös katalyyttisellä vedytyksellä. Fosfotriesterin vedytys voidaan tehdä katalyyttisesti käyttämällä aktiivihieleen sidottua palladiumia ja PdO:a. Vedytys tehdään vedessä, huoneenlämmössä ja käytetään vetykaasua, jonka paine on 1 atm.³⁴ Vedytys voidaan tehdä myös etanolissa ja siihen voidaan tarvittaessa lisätä NaHCO_3 -vesiliuosta, jos olosuhteiden pitää olla neutraalit.³⁶

2.5 2-(Trialkyylisilyyli)etyyliryhmä

Trialkyylisilyylietyyliryhmillä voidaan suojata fosfaatteja ja ne poistetaan nukleofiilillä.³⁷ Suojaryhmä irrotetaan β -fragmentaatioreaktiolla. Nukleofiilin hyökkäys piihin johtaa Si-C-sidoksen katkeamiseen. Reaktiossa vapautuu suojattu fosfaatti ja muodostuu nukleofiilillä substituoitu trialkyylisilaani ja etyleeni.



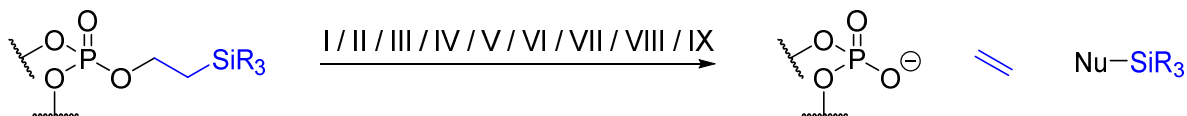
Kaavio 10. Reaktiomekanismi 2-trialkyylisilyylietyyliryhmien irrottamisesta fosfaateista.

Fosfaattien suojaryhminä voidaan käyttää: trimetyyli-³⁸, trietyyli-, dimetyyli-*tert*-butyyli-, difenyylimetyyli-³⁹⁻⁴² ja trifenyylisilyyliä^{43, 44}. Suojaryhmät lisäävät lipofiilisyyttä, mistä on etua kromatografisissa puhdistuksissa.⁴⁵ Erityisesti 2-(trifenyylisilyyli)etyyliryhmä vaikuttaa lipofiilisyyteen samalla tavalla kuin trityylisuojaryhmät.⁴³ Trialkyylisilyylietyyliryhmät lisätään fosforamidiitti- tai fosfiittitriesterimenetelmällä, koska ne eivät kestä asyylihalidikytkentäreagensseja.^{40,45} Poikkeuksen muodostavat trifenyyli- ja difenyylimetyylisilyylietyyli, koska ne ovat erityisen stabiileja ja kestävät reaktiot kytkentäreagenssien kanssa. 2-(Difenyylimetyylisilyyli)etyyliryhmää käytetään eniten.

Suojaryhmä on stabiili³⁸ vahvoille ei-nukleofiilisille emäksille vedettömissä olosuhteissa ja poistetaan nukleofiilisillä reagensseilla. Suojaryhmä voidaan irrottaa ammoniakkivesiliuoksella.^{40,41,44} Reaktiota voidaan nopeuttaa lämmittämällä reaktioseosta ja lisäämällä keraliuottimia, kuten etanolia^{37,41}. Metyyliamiini on myös hyvä nukleofiili suojaryhmän irrottamiseen vedessä.^{37,44} Suojaryhmä voidaan poistaa myös Brönstedin hapolla tai Lewisin hapolla. Brönstedin happona voidaan käyttää trifluorietikkahappoa DCM:ssä.⁴⁶ Lewisin happona voidaan käyttää ZnCl_2 :a tai ZnBr_2 :a nitrometaani-isopropanoliliuoksessa.⁴⁷ Paras nukleofiili on fluoridi-ioni ja käytettyjä reagensseja ovat TBAF, HF, $\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$, NH_4F ja SiF_4 .

TBAF:a käytetään THF:ssä^{37,44,45} ja fosfaatin liukoisuuden lisäämiseksi käytetään keraliuottimina³⁹ vettä ja pyridiiniä. Reaktio voidaan tehdä myös DMSO-liuoksessa 70 °C lämpötilassa.^{43,48} Väkevää HF:n vesiliuosta käytetään usein keraliuottimien, kuten ACN:n ja THF:n, kanssa ja reaktiot tehdään huoneenlämmössä.^{38,46,48} $\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$:a käytetään THF:ssä

huoneenlämmössä.⁴⁹ NH_4F :a käytetään metanolissa 60 °C:ssa.⁴⁸ Kaasumaista SiF_4 :a⁴² käytetään vähemmän, mutta suojauksen poisto on mahdollinen normaalissa ilmanpaineessa asetonitriililiuoksessa, jossa on 1 % vettä.



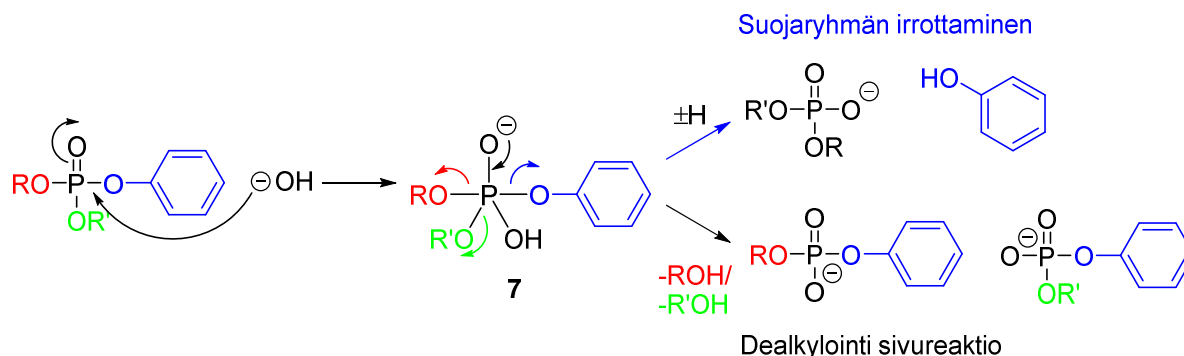
Kaavio 11. I) väkevä ammoniakkivesiliuos 55 °C:ssa (EtOH), II) MeNH_2 vedessä, III) Trifluorietikkahappo DCM :ssa, IV) ZnCl_2 tai ZnBr_2 nitrometaani-isopropanoliliuoksessa, V) TBAF THF:ssa (H_2O , Pyr) tai DMSO :ssa 70 °C:ssa, VI) väkevä HF :n vesiliuos ACN :ssä ja/tai THF:ssa VII) $\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$ THF:ssa, VIII) NH_4F :a metanolissa 60 °C:ssa, IX) SiF_4 1 % vettä ACN :ssä.

3. Fenyylisuojarahmät

3.1 Fenyyliryhmä

Fenyyliryhmää ja elektroneja puoleensa vetävillä ryhmillä substituoituja fenyyliryhmiä on käytetty fosfotriesterien suojarahminä. Fenyylisuojarahmä irrotetaan fosfotriesteristä emäshydrolyyttisesti. Hydroksidi-ioni hyökkää fosforiin ja korvaa fenyylin. Fenyyliryhmän fosfoesterisidoksen katkaisemiseksi käytetään 0,1 M tai 0,2 M NaOH vesi-dioksaaniliuosta. Reaktio tehdään huoneenlämmössä ja vettä sekä dioksaania käytetään suhteessa 1:1 tai 4:1.⁵⁰⁻⁵³

Fosfotriestereiden fenyyliryhmän poisto emäshydrolyyttisesti on hidas prosessi eikä onnistu aina täydellisesti.⁵² Lisäksi voi tapahtua dealkylointisivureaktio.⁵¹ Tämä tarkoittaa oligonukleotidien kohdalla niiden hajoamista pienemmiksi fragmenteiksi. Hydroksidi-ionin hyökätessä fosforiin muodostuu välivaihe 7, josta voi irrota alkyyli- tai fenyyliryhmä. Välivaiheesta irtoaa useimmin fenyyliryhmä. Fenolit ovat happamempia kuin alkoholit ja siten fenyyliryhmä on parempi lähtevä ryhmä. Fenyyliryhmän poistaminen ja samaan aikaan mahdollisesti tapahtuva sivureaktio esitetään kaaviossa 12.



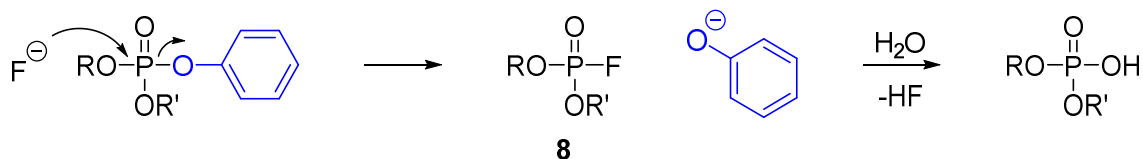
Kaavio 12. Fenyyliryhmän irrottaminen fosfotriesteristä hydroksidi-ionilla. Reaktiossa muodostuu välivaihe **7**, josta voi irrota fenyylisuojarahmā tai alkyyli-ryhmät. Vaihtoehtoiset dealkyloinnit on merkitty punaisella ja vihreällä. Fenyylisuojarahmā irtoaa useimmin, koska se on parempi lähtevä ryhmä.

Lisäämällä elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä fenolin aromaattiseen renkaaseen voidaan laskea sen pK_a :ta. Käyttämällä happamempia substituoituja fenyyliä fosfotriestereiden suojarahminä nopeutetaan suojarahmien poistoa emäshydrolyysillä ja vähennetään dealkylointia. Fluorilla, kloorilla ja nitroryhmällä substituoituja fenyyliryhmiä on vertailtu fosfotriesterin suojarahmänä.²⁰ *Orto*- ja *para*-kloorifenyylit ovat osoittautuneet parhaimmiksi. Kloorifenyyleillä suojattujen dinukleosidifosfotriesterin emäshydrolyysin reaktioaika on vain kuudesosa verrattuna fenyylillä suojattuihin. Ne voidaan kuitenkin pestä ja uuttaa vedellä, kun vastaavassa käsittelyssä dikloorifenyylillä suojatut analogit hydrolysoituvat.^{51,53}

Orto- ja *para*-kloorifenyyliden emäshydrolyysi fosfotriestereistä tehdään samoissa olosuhteissa kuin substituotumattoman fenyyliryhmän.^{20,53–56} *Para*-nitrofenyyliryhmä, joka on kloorifenyylejä labiilimpi suojarahmā, voidaan irrottaa hyvin 0,05 M NaOH:lla dioksaani-vesiliuoksessa.²⁰ Pitempien oligonukleotidien *orto*- ja *para*-kloorifenyyliryhmien poistamisen reaktioaika voi olla hyvin pitkä, minkä takia dealkylointia tapahtuu. Käyttämällä 1:9 vesi-DMSO-liuosta voidaan vähentää dealkylointia.⁵¹ Ammoniakkivesiliuosta voidaan myös käyttää emäshydrolyysiin ja sen sanotaan muodostavan vähemmän sivutuotteita.^{51,57} Ammoniikkiin voidaan lisätä DMSO:⁵¹, pyridiiniä⁵⁷ tai dioksaania¹⁸ parantamaan oligonukleotidien liukoisuutta.

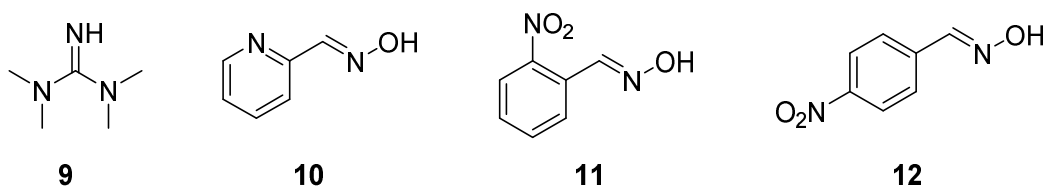
Fenyylit-, *orto*-kloorifenyylit- ja *para*-kloorifenyyliryhmät voidaan poistaa fluoridi-ioneilla. Reaktiot tehdään huoneenlämmössä. Liuottimeksi sopivat THF¹⁹, pyridiini-vesiliuos⁵⁸ tai THF-pyridiini-vesiliuos^{20,59}. Fluoridi-ionilähteenä käytetään tetraetyyliammoniumfluoridia tai TBAF:a. Fluoridi-ioni hyökkää todennäköisesti fosforiin ja substituoi fenyyliryhmän.⁵⁸

Väliuotteessa **8** on korkeaenerginen P-F-sidos, joka hydrolysoituu ja muodostuu fosfaatti.⁵⁸ Fenyyliryhmän irrottaminen fosfotriesteristä esitetään kaaviossa 13.



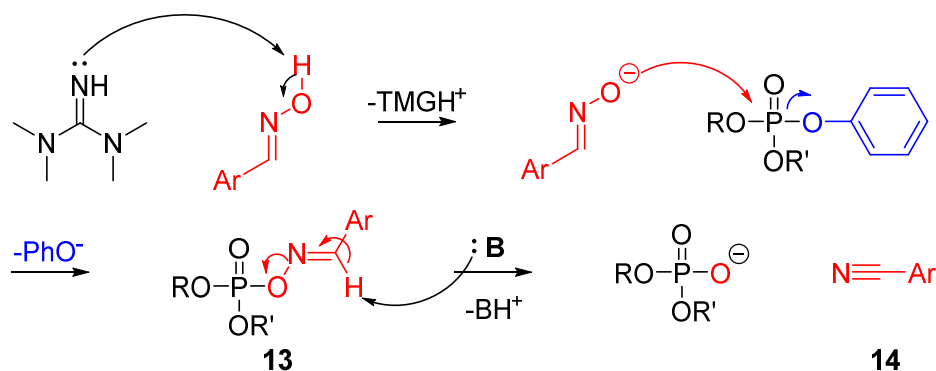
Kaavio 13. Fenyyliryhmän poistaminen fluoridi-ionilla. Muodostunut väliuote **8** hydrolysoidaan fosfaatiksi.

Fenyylisuojaajiryhmiä poistetaan *N,N,N',N'*-tetrametyyliguanidiinilla (TMG) **9** ja aryylialdoksiimeilla paremmalla saannolla kuin hydroksidi-ionilla, ammoniakilla tai fluoridi-ionilla.⁵⁹ Aryylialdoksiimeja, joita käytetään fenyyliryhmän poistoon, ovat (*E*)-pyridiini-2-karboksialdoksiimi^{2,58-61} **10**, (*E*)-*orto*-nitrobentsaldoksiimi **11** ja (*E*)-*para*-nitrobentsaldoksiimi **12**.^{59,62,63} Fenyyliryhmiä ei voida poistaa tällä menetelmällä fosfotriestereistä, joissa on silyylisuojaus², koska ne hajoavat osittain.⁶⁴



Kuva 2. Kuvassa on emäs *N,N,N',N'*-tetrametyyliguanidiini **9** ja aryylialdoksiimit (*E*)-pyridiini-2-karboksialdoksiimi **10**, (*E*)-*orto*-nitrobentsaldoksiimi **11** ja (*E*)-*para*-nitrobentsaldoksiimi **12**.

TMG on emäs, joka deprotonoi aryylialdoksiimin. Aryylialdoksimaatti toimii nukleofiilinä ja hyökkää fosforiin. Aryylialdoksiimi syrjäyttää fenyyliryhmän ja muodostuu oksiiimesteriväliuote **13**. Seuraavaksi väliuotteesta **13** vapautuu fosfaatti eliminaatioreaktiossa. Reaktiossa muodostuu arylinitriiliä⁶⁴ **14**. Reaktio esitetään kaaviossa **14**.⁵⁹



Kaavio 14. Fenyyliryhmän poistaminen fosfotriesteristä TMG:lla **9** ja aryylaldoksiimilla. Oksiimiesterin **13** eliminaatioreaktiossa vapautuu fosfaatti ja muodostuu arylynitriliä **14**.

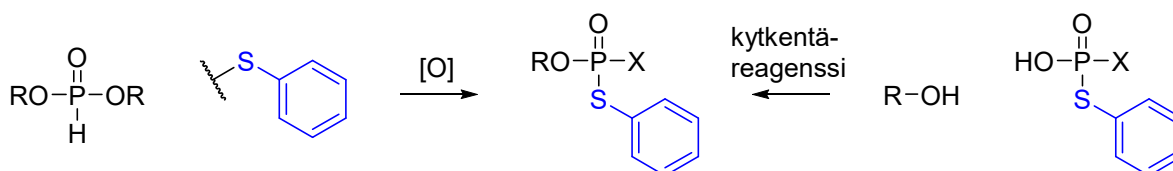
Sama määrä TMG:a ja aryylaldoksiimia lisätään fosfotriesteriliuokseen. TMG:a ja aryylaldoksiimia käytetään suuri ylimäärä. Fenyyliryhmän poisto tehdään huoneenlämmössä ja reaktioaika riippuu fenyyliryhmien määrästä molekyylissä. Reaktion liuottimena käytetään dioksaania^{58–62,64} tai ACN:ä⁵⁹ ja vettä. Reaktiossa käytetään poolista orgaanista liuotinta ja vettä, koska halutaan varautuneen fosfaattiesterin pysyvän liuenneena.⁶⁴ Pidemmässä oligonukleotideissa on poistettavana monta fenyyliryhmää. Fenyyliryhmien poisto ei etene loppuun asti, jos oligonukleotidi saostuu vaiheessa, jossa vain osa fenyyliryhmistä on irronnut.

(*E*)-pyridiini-2-karboksialdoksiimi **10** ja (*E*)-*orto*-nitrobentsaldoksiimi **11** ovat suunnilleen yhtä reaktiivisia ja ovat noin 2,5 kertaa nopeampia poistamaan *orto*-kloorifenyyliryhmän kuin (*E*)-*para*-nitrobentsaldoksiimi **12**. *Orto*-kloorifenyyliryhmä irtoaa 2,5 kertaa nopeammin kuin *para*-kloorifenyyliryhmä, kun reagenssina käytetään TMG:a ja aryylaldoksiimia. Fenyyliryhmän poistamista voidaan nopeuttaa myös vähentämällä veden määrää liuotinsysteemissä.⁶⁴

Aryylaldoksiimeja voidaan käyttää myös vedettömissä olosuhteissa. Fenyyliryhmä voidaan poistaa DCM:ssä⁵⁹, johon lisätään TEA:a tai *N*-metyylimorfoliinia, tai pelkästään TEA:ssa⁶³. Emästä tarvitaan aldoksiimin deprotonoimiseen.

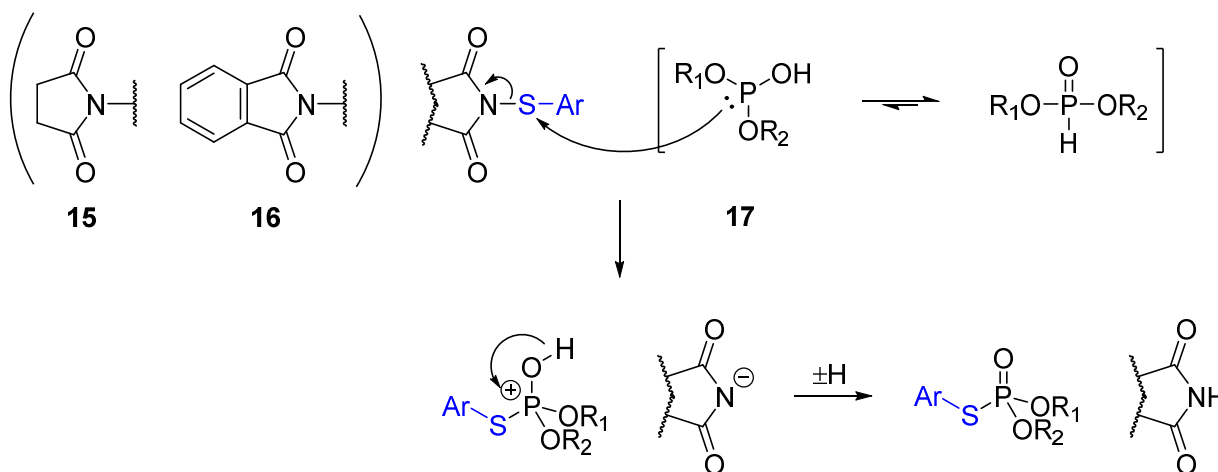
3.2 Fosfaatin suojaaminen *S*-fenyylifosforotioaattina

Fosfaatit voidaan suojata *S*-fenyylifosforotioaattina. *S*-fenyylifosforotioaatteja valmistetaan fosforyloimalla alkoholeja fosforotioaatilla⁶⁵ tai hapettamalla^{66–71} vetyfosfonaatti *S*-fenyyli-tioryhmäluovuttajan kanssa. Fenyylitioryhmän lisäksi voidaan käyttää *para*-kloori-^{66,67} ja *para*-metyylifenyylitioryhmää^{53,68,70}



Kaavio 15. *S*-fenyyli-tioryhmä-fosforotioaatteja voidaan valmistaa hapettamalla vetyfosfonaatteja tai fosforyloimalla fosforotioaatilla. R = alkyliryhmä tai H ja X = SPh tai OR.

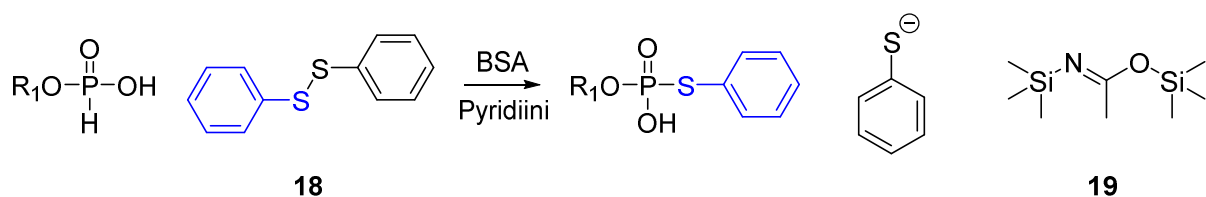
Nukleosidivetyfosfonaatit voidaan hapettaa fosforotioaatiksi käyttämällä sukkinimidi-⁷¹ **15** tai ftalimidireagensseja^{66–68} **16** joiden tyypissä on kiinni fenyylitioryhmä. Hapetusreaktiossa vetyfosfonaatti reagoi fosfiittitautomeerin **17** kautta.⁷¹ Fosfiitin fosforilla on vapaa elektronipari, joka voi hyökätä rikkiin. Fosforotioaattien valmistus sukkinimidillä ja ftalimidillä esitetään kaaviossa 16. Hapetusreaktio tehdään DCM:ssä, johon lisätään pyridiiniä tai DIPEA:a, ja reaktioaika on 15 minuuttia.



Kaavio 16. Vetyfosfonaattien hapettaminen fosforotioaatteiksi sukkinimidi- **15** tai ftalimidireagenssilla **16**. Hapetusreaktio tapahtuu vetyfosfonaatin fosfiittitautomeerin **17** kautta. Kaaviossa R_1 ja R_2 ovat alkyliryhmiä tai H ja Ar on fenyyl-, 4-kloorifenyyl- tai 4-metyylifenyyliryhmä.

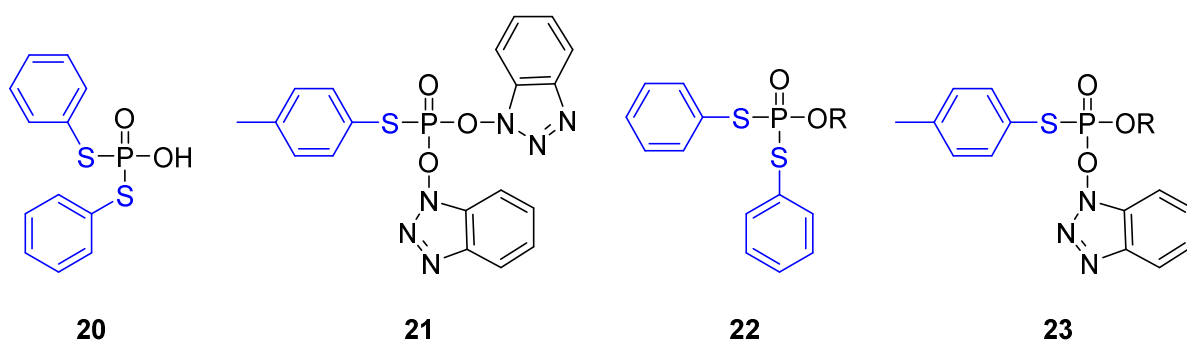
Nukleosidivetyfosfonaattimonoesteri voidaan hapettaa fosforotioaatiksi myös difenyylidisulfidilla **18**. Hapetusreaktioon pitää lisätä *bis*-(trimetyylisilyyli)asetamidia (BSA)

19. Hapetusreaktio tehdään kuivassa pyridiinissä ja reaktioaika on 2 tuntia. Hapetusreaktio esitetään kaaviossa 17.⁶⁹



Kaavio 17. Vetyfosfonaattimonoesterin hapettaminen *S*-fenyylifosforotioaatiksi difenyylidisulfidilla **18**. Reaktioon lisätään BSA:ta **19**. R₁ on nukleosidi.

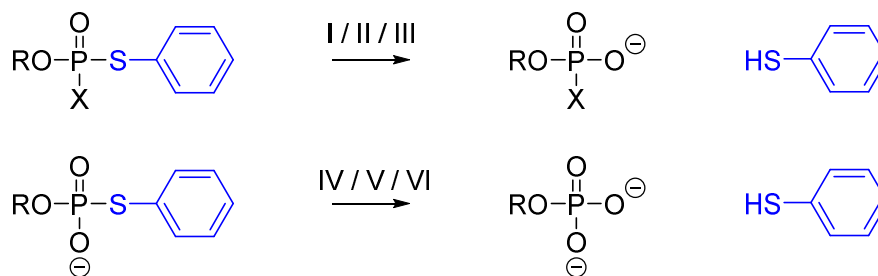
Alkoholi voidaan fosforyloida fosforotioaatilla. Fosforylointiin käytetään *S,S*-difenyylifosforoditioaattia⁶⁵ **20** tai *S*-4-metyylifenyyl-O,O-bis[1-bentsotriatsolyyli]fosforotioaattia⁷⁰ **21**. Kytkentäreagenssia pitää käyttää, kun fosforyloidaan fosforoditioaatilla **20** ja muodostuu suojattu fosforoditioaatti **22**. Fosforotioaatti **21** on jo aktivoitu ja siitä muodostuu **23**. Edellä mainitut molekyylit ovat kuvassa 3.



Kuva 3. Kuvan fosforotioaatteja **20** ja **21** käytetään alkoholin fosforyloimiseen. Fenyylitiosuojaryhmä on fosforyloinnin jälkeen suoraan tuotteissa **22** ja **23**, eikä sitä tarvitse erikseen lisätä.

Fosforotioaattitriesteristä voidaan poistaa yksi fenyylitioryhmä käyttämällä arylioksiimeja.^{66–68,71,72} Suojaryhmän poistamisessa käytetään samoja reaktio-olosuhteita, kuin fenyyliryhmän poistossa, mutta ACN:n käyttöä liuottimena suositaan. Arylioksiimeilla ei voida poistaa fenyylitioryhmää fosforotioaatidiesteristä.⁷⁰

Fenyylitioryhmän selektiivinen poisto fosforotioaattitriesteristä voidaan tehdä myös emäshydrolyytisesti. Dioksaaneissa 0,1 M NaOH-liuoksella voidaan hydrolysoida fenyylitioryhmä ilman merkittävää dealkylointia.⁶⁹ Vesi-TEA-pyridiini-liuoksessa suhteessa 1:2:2 voidaan poistaa selektiivisesti yksi fenyylitioryhmä nukleosidi-*S,S*-difenyylifosforoditioaatista.⁶⁵

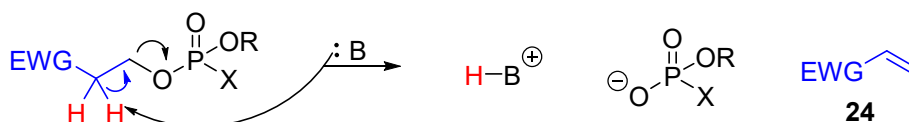


Kaavio 18. Fenyylitioryhmä voidaan poistaa fosforotioaattitriesteristä ainakin kolmella tavalla: I) TMG **9** ja arylioksimi **10**, **11** tai **12** ACN:ssä, II) 0,1 M NaOH dioksaanissa, III) H₂O:TEA:Pyridiini 1:2:2. Fenyylitioryhmä voidaan poistaa fosforotioaattidiesteristä ainakin kolmella tavalla: IV) hapetus *N*-kloorisukkinimidillä tai NaIO₄:lla ja emäshydrolyysi, V) I₂ vedessä, VI) H₃PO₂, Pyridiini, TEA.

Fenyylitioryhmän irrottaminen fosforotioaattidiesteristä on huomattavasti vaikeampaa kuin fosforotioaattitriesteristä. Fenyylitioryhmästä voidaan kuitenkin tehdä parempi lähtevä ryhmä hapettamalla. 4-metyylifenyylitioryhmä hapetetaan *N*-kloorisukkinimidillä tai NaIO₄:lla, minkä jälkeen se irrotetaan emäshydrolyysillä.⁵³ Hapetus ja hydrolyysi voidaan tehdä yhdessä vaiheessa käyttämällä I₂:a vedessä.⁷⁰ Fenyylitioryhmä voidaan irrottaa fosforotioaattidiesteristä ilman hapettamista. Käyttämällä 5 M:sta hypofosforihapoketta pyridiiniliuoksessa ja TEA:a voidaan irrottaa fenyylitioryhmä.⁶⁵ Kaaviossa 18 on koottuna fenyylitioryhmällä suojattujen fosforotioaattidiesterien ja -triesterin suojaryhmän irrottaminen.

4. β-Eliminoituvat suojaryhmät

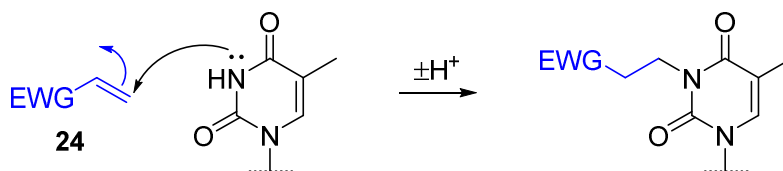
β-Eliminoituissa suojaryhmissä on elektroneja puoleensa vetävä ryhmä β-asemassa lähtevään ryhmään nähden. Elektroneja puoleensa vetävä ryhmä tekee samassa hiilessä kiinni olevat vedyt happamemmiksi. Riittävän vahva emäs pystyy deprotonoimaan β-aseman ja fosfo- tai vetyfosfonaattiesteri toimii lähtevänä ryhmänä. Eliminaatio vapauttaa suojatun molekyylin ja suojaryhmästä muodostuu alkeeni **24**. Kaaviossa 19 esitetään β-eliminaatio.



Kaavio 19. β-Eliminaatioreaktiossa emäs deprotonoi suojaryhmän ja vapauttaa fosfaatin tai fosfonaatin. Eliminaatioreaktiossa muodostuu alkeeni **24**, joka on hyvä Michaelin akseptori. EWG on elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, R on alkyyliryhmä, X on H tai OR ja B on emäs.

β-Eliminaatiotuote **24** on Michaelin akseptori ja voi alkyloida nukleinihappomäksiä. Nukleinihappomäs voi pehmeänä nukleofiilinä hyökätä Michaelin akseptoriin ja seurauksena

on sivutuotteisiin johtava konjugoitu additioreaktio. Suojaryhmä irtaa huomattavasti huonommin nukleinihappoemäksestä kuin fosfaatista, koska emäsosa on huomattavasti lähtevä ryhmä. Deoksiribonukleosideista tymiini on alttiimpi alkyloitumaan kuin adenini, guaniini tai sytosiini.^{73–75}

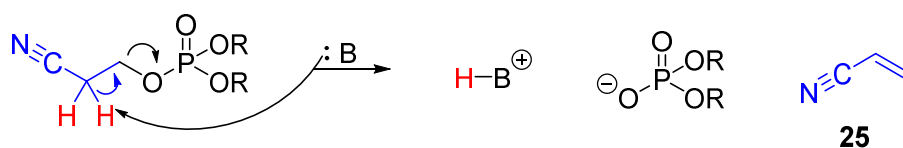


Kaavio 20. Tymiinin alkylointireaktio Michaelin akseptorin **24** kanssa.

Oligonukleotidien emäsosien alkyloituminen on sivureaktio, jolta halutaan välttyä. Sivureaktiota voidaan estää käyttämällä suojaryhmiä^{73,75}, jotka eivät muodosta Michaelin akseptoreita, kun niitä poistetaan. Nukleinihappoemäkset voidaan myös suojata⁷⁴ niin, että Michaelin additio ei ole mahdollista. Sivureaktiota voidaan estää käyttämällä emäksiä, jotka reagoivat nukleofiileina suojauksen poistossa muodostuvien Michaelin akseptorien kanssa. Primääriset amiinit, kuten *tert*-butyliamiini⁷⁶ ja metyyliamiini⁷⁵, soveltuvat tarkoitukseen hyvin. Kaappariyhdisteitäkin käytetään, jos amiineja ei haluta käyttää. Nitrometaania käytetään kaappariyhdisteenä suojauksen poistossa ja se reagoi eliminaatiotuotteen **24** kanssa ennen kuin se ehtii alkyloida nukleinihappoemäksen.⁷⁵ Nukleinihappoemäksen alkylointi on erityisen ongelmallista pitkien oligonukleotidien suojauksen poistossa ja reaktioissa, joissa käytetään hyvin pieni määrä liuotinta.⁷³

4.1 β -Syanoetyyliryhmä

β -Syanoetyylisuoja ryhmä on ollut käytössä hyvin kauan.⁷⁷ Sen käyttö yleistyi, kun oligonukleotidien synteesissä vakiintui fosforamidiittimenetelmä.⁶ Suojaryhmän tiedettiin olevan emäslabiili ja muodostavan akrylynitriiliä **25**, kun se poistetaan.⁷⁷ Suojaryhmän irrottaminen emäksellä esitetään kaaviossa 21. Aluksi β -syanoetyylin poistamisessa suosittiin vesiliuoksia, koska ryhmällä suojattiin fosfotriestereitä. Suojauksen poistossa vapautuva fosfodiesteri liukenee huomattavasti nopeammin orgaanisiin liuottimiin.



Kaavio 21. β -Syanoetyylisuoja ryhmän irrottaminen fosfaatista emäksellä β -eliminaatioreaktiossa. Reaktiossa muodostuu akrylynitriiliä **25**. R on alkyliryhmä tai H.

Fosfotriestereistä on irrotettu β -syanoetyyliryhmä NaOH-vesiliuoksilla, joiden konsentraatio vaihtelee 0,05-0,4 M. Reaktioon lisättiin tarpeen vaatiessa erilaisia liuottimia vaihteleva määrä: dioksaania^{20,55,78,79}, etanolia^{78,79} ja pyridiiniä¹⁴. Poolisia orgaanisia liuottimia käytettiin parantamaan fosfotriesterien liukoisuutta. Eliminaatioreaktio tehdään huoneenlämmössä.

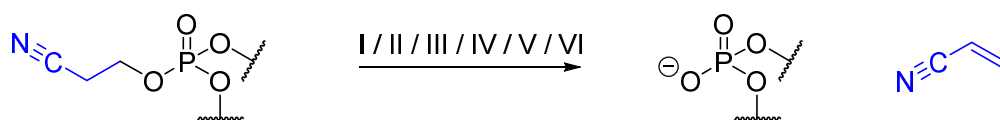
Myös ammoniakkin vesiliuoksella voidaan eliminoida β -syanoetyyliryhmä. Ammoniakin käyttö yleistyi, koska oligonukleotidisynteesin lopussa voitiin poistaa myös emässuojaryhmät pidemmällä reaktioajolla ja saatiin tuote yhdellä reaktiolla. Fosfotriesterien liukoisuutta parannettiin lisäämällä metanolia, etanolia tai pyridiiniä.^{2,75,76,80-82}

Kun kiintokantajasynteesiä kehitettiin oligonukleotidisynteesille fosfotriesterimenetelmällä, NaOH-käsittelyä pidennettiin monen tunnin pituiseksi, koska sekvenssi voitiin irrottaa kiintokantajasta samoissa olosuhteissa.^{78,79} Kiintokantajasynteesi nousi pintaan uudelleen fosforamidiittimenetelmän kehittyessä. Sinä aikana suosittiin ammoniakkin käyttöä. Ammoniakkikäsittelyn reaktioaikaa pitkitettiin ja lämpötilaa nostettiin 50-55 °C:een. Näissä olosuhteissa voitiin β -syanoetyylin poistamisen lisäksi irrottaa emässuojaryhmät ja tuote kiintokantajasta.^{6,82}

Oligonukleotidien liuossynteesissä β -syanoetyyliryhmän poistaminen emäksisillä vesiliuoksilla koitui ongelmaksi. Suojaryhmät, jotka pitää poistaa emäshydrolyytisesti viimeisessä vaiheessa, irtosivat osittain β -syanoetyyliryhmän poistossa.⁸¹ Odottamattomilta

emäshydrolyyseiltä välttään käyttämällä vedettömiä olosuhteita ja hyödyntämällä eliminaatioreaktiota.^{81,83} Steerisesti estyneiden amiinien, esimerkiksi TEA:n, ajateltiin olevan hyviä emäksiä eliminaatioreaktioihin, koska ne eivät ole nukleofiilisiä. Kuivalla TEA-pyridiiniliuoksella on poistettu selektiivisesti β -syanoetyyliryhmiä fosfotriestereistä huoneenlämmössä.^{61,81,83} Vahvemmallalla emäksellä, kuten *tert*-butoksidilla THF-*tert*-butanoliliuoksessa, voidaan myös selektiivisesti irrottaa β -syanoetyyli.⁸³ β -Syanoetyyliryhmä voidaan poistaa vedettömissä olosuhteissa fosfotriesteristä myös TBAF:lla.¹⁹

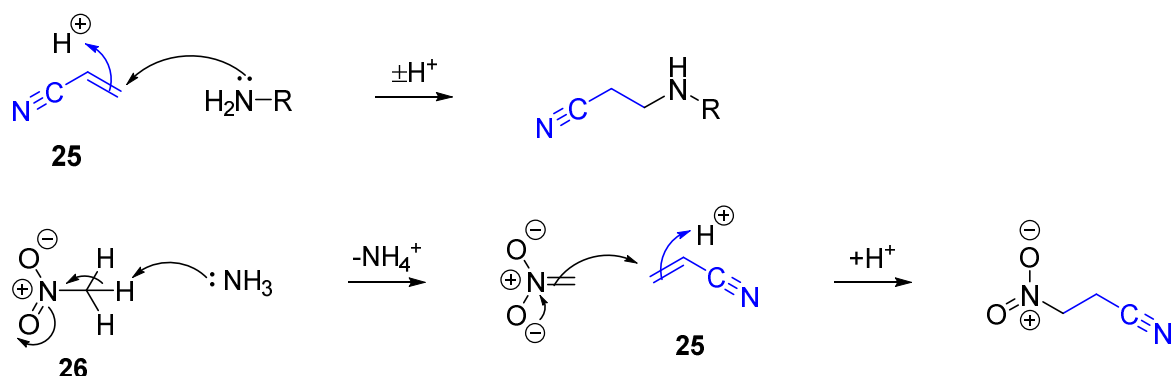
β -Syanoetyyliryhmän irrottamista erilaisilla amiineilla tutkittiin systemaattisemmin.⁸⁴ Eliminaatioreaktio on nopein primäärisillä amiineilla ja hitain tertiäärisellä amiinilla. Primäärysten ja sekundäärysten amiinien käyttöä suositeltiin, koska reaktioaika on minuuteista yhteen tuntiin, kun taas TEA:lla reaktio kestää kolme tuntia. Primäärisistä amiineista suositellaan *tert*-butyyliamiinin käyttöä β -syanoetyyliryhmän irrottamiseen oligonukleotidisynteesissä. *n*-Propyyliamiini on niin nukleofiilinen, että se saattaa hyökätä emässuojaryhmiin, mutta *tert*-butyyliamiinilla ei havaittu tällaisia sivureaktioita. Kiintokantajasynteesissä voi selektiivisesti eliminoida β -syanoetyyliryhmän 2:1 pyridiini-diisopropyyliiliuoksella⁶⁰ huoneenlämmössä puolessa tunnissa. Kaavioon 22 on koottu reaktioolosuhteet, joissa irrotetaan β -syanoetyyliryhmä.



Kaavio 22. I) 0,05-0,4 NaOH, vesi ja keraliutin, II) NH_3 , vesi ja keraliutin, III) amiinia pyridiinissä tai ACN:ssä, IV) TBAF:a THF:ssä, V) *tert*-butoksidia THF:ssä ja *tert*-butanolissa ja VI) DBU:a ACN:ssä.

Eliminaatioreaktiossa muodostuu akryylnitriiliä **25**, joka voi syanoetyloidä nukleinihappoemäksiä.⁷⁴⁻⁷⁶ Alkylointia tapahtuu erityisen paljon silloin, kun reaktiossa ei ole mitään, joka reagoisi akryylnitriilin kanssa. Esimerkiksi eliminaatio ammoniakkivesiliuoksessa^{75,76} tai DBU:lla asetonitriilissä^{74,75}. Emästen alkyloitumiselta voi välttyä eliminaatioreaktiossa käyttämällä primäärisiä amiineja, esimerkiksi *tert*-butyyliamiinia⁷⁶ ACN:ssä tai metyyliamiinia⁷⁵ vesi-etanoli-ACN-liuoksessa (1:1:6). Primääriset amiinit toimivat reaktiossa emäksenä ja kaappariyhdisteenä, joka reagoi akryylnitriilin **25** kanssa.⁷⁵ Eliminaatioreaktio voidaan tehdä ammoniakkivesiliuoksella

ACN:ssä minimaalisilla alkylointireaktioilla lisäämällä kaappariyhdiste nitrometaania **26**.⁷⁵ Primäärysten amiinien ja nitrometaanin reaktio akrylinitriilin kanssa esitetään kaaviossa 23.

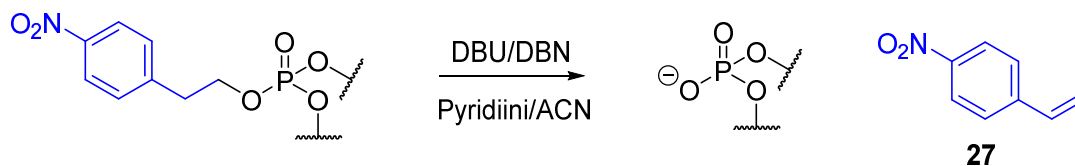


Kaavio 23. Primäärysten amiinien ja nitrometaanin **26** reaktio akrylinitriilin **25** kanssa. Nitrometaani **26** toimii nukleofiilina ammoniakkin deprotonoinnin jälkeen. R on *tert*-butyyli- tai metyyli-ryhmä.

β -Syanoetyyliryhmää on käytetty myös vetyfosfonaattidiestereissä. Hydrofiiliset vetyfosfonaattimonoesterit voidaan suojata β -syanoetyylillä neutraaleiksi molekyyleiksi ja uuttaa orgaaniseen liuottimeen. Suojaryhmä eliminoidaan DBU:lla asetonitriilissä.⁸⁵

4.2 *Para*-nitrofenetyyliryhmä

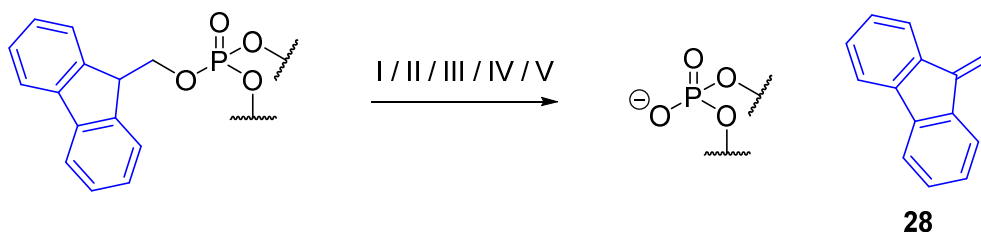
Para-nitrofenetyyliryhmä on erityisen stabiili emäksellä irrotettava suojaryhmä. Suojaryhmä on stabiili emäskäsittelyissä, joissa käytetään noin 0,2 M NaOH-vesiliuosta⁶³, ammoniakkin vesiliuosta, TEA:a tai pyridiiniä.⁸⁶ β -Eliminaatioreaktioon käytetään yleensä 0,5 M DBU tai DBN pyridiini- tai ACN-liuosta ja suojauksen poisto tehdään huoneenlämmössä.^{2,63,86–88} Reaktioaika on pidempi, jos molekyylistä pitää irrottaa useampi *para*-nitrofenetyyliryhmä. Menetelmällä voidaan poistaa *para*-nitrofenetyyliryhmä sekä fosfotriestereistä että fosfodiestereistä. Suojaryhmän β -eliminaatioreaktiossa muodostuu *para*-nitrostyreeniä **27**, joka voi oligonukleotidien suojaryhmien poistoon tarvittavan suhteellisen pitkän reaktioajan aikana alkyloida emäsosia.⁸⁸ Alkylointia tapahtuu kuitenkin huomattavasti vähemmän verrattuna β -syanoetyyliryhmään.⁸⁸ *Para*-nitrofenetyylin irrottaminen fosfaateista esitetään kaaviossa 24.



Kaavio 24. *Para*-nitrofenetyyliryhmän poistaminen fosfaatista. β -eliminaatioreaktiossa muodostuu *para*-nitrostyreeniä, joka voi alkyloida emäsosia pitkittyneissä reaktioissa.

4.3 Fluorenyylimetyyliryhmä

Fluorenyylimetyyliryhmä on suojaryhmänä samankaltainen kuin β -syanoetanoli. Fluorenyylimetyyli on huomattavasti isompi ja sitä on käytetty lisäämään fosfodiesterien lipofiilisyyttä.⁸⁹ Lipofiilisen suojaryhmän avulla fosfodiesterit on voitu uuttaa orgaaniseen faasiin vesifaasin sijaan.⁹⁰ Fluorenyylimetyyliryhmän eliminaatioreaktiossa muodostuu dibentsofulveenia **28**.

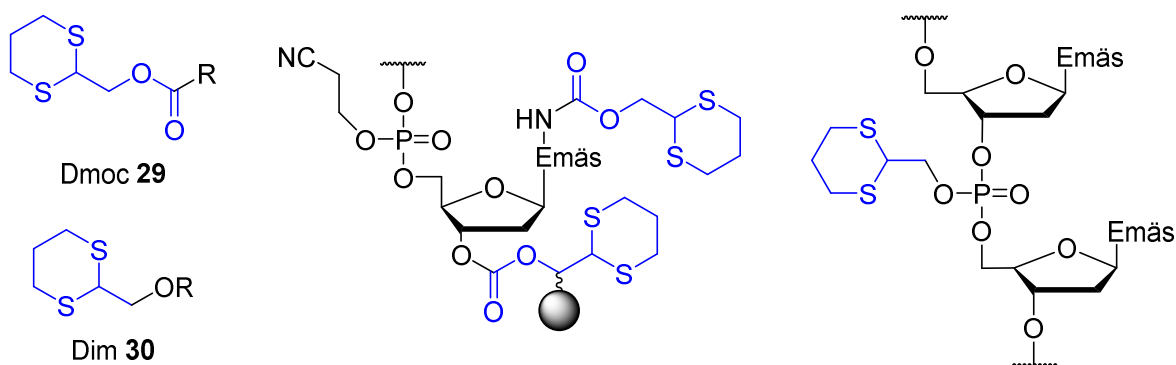


Kaavio 25. Fluorenyylimetyyli poistetaan β -eliminaatioreaktiolla ja siihen voidaan käyttää seuraavia emäksiä: I) NH_3 :a, II) TEA:a, III) piperidiiniä, IV) *tert*-butyyliamiinia ja V) DBU:a. Reaktiossa muodostuu dibentsofulveenia **28**.

Fluorenyylimetyyliryhmä voidaan irrottaa ammoniakilla^{90,91}, TEA:lla^{92–96}, piperidiinillä^{91,97}, *tert*-butyyliamiinilla⁸⁹ ja DBU:lla⁹³. Ammoniakkia käytetään vesiliuoksena ja reaktiota voidaan nopeuttaa lämmittämällä. Amiinien kanssa käytetään keraliuotinta, kuten pyridiiniä, DCM:a ja ACN:ä ja eliminaatioreaktio tehdään huoneenlämmössä. Fluorenyylimetyyliryhmän irrottaminen fosfodiesteristä on hitaampi kuin fosfodiesteristä, mutta irrottamiseen ei vaadita vahvempia emäksiä.⁹³ Fluorenyylimetyyli on suojaryhmänä niin stabiili pyridiinissä, että sitä voidaan käyttää liuottimena kytkentäreaktioissa⁸⁹ ja fosforyloinnissa. Fluorenyylimetyyliä on käytetty nukleosidivetyfosfonaatin väliaikaisena suojaryhmänä fosfityloinnin aikana.⁹²

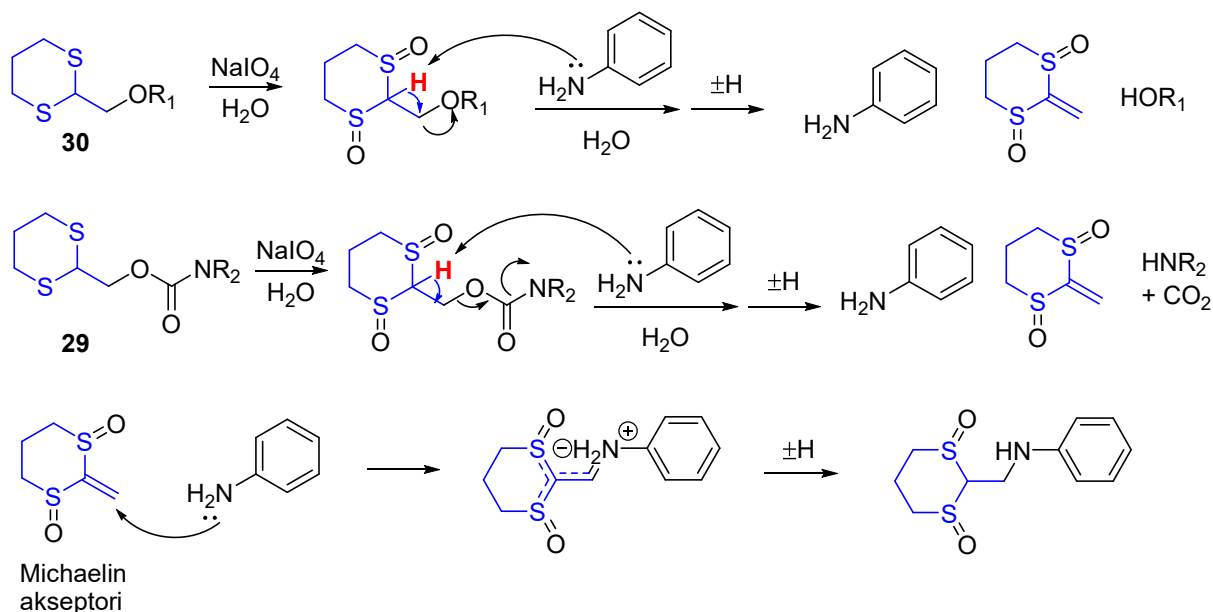
4.4 1,3-Ditia-2-yylimetyyli johdannaiset (Dim)

Varsin uusi vuonna 2016 julkaistu suojaryhmä on 1,3-ditia-2-yylimetoksikarbonyylisuojaryhmä (Dmoc) **29**.⁹⁸ Suojaryhmää käytetään nukleiinihappoemästen eksosyklisen amiinin suojaamisessa ja kantajaan kiinnittämisessä. Yksi oligonukleotidisynteesin haasteista on valmistaa sekvenssejä, jotka sisältävät elektrofiilisiä funktionaalisuuksia, kuten α -klooriasetyyliryhmä.⁹⁹ Funktionalisuudet eivät välttämättä kestä oligonukleotidisynteesin lopussa sekvenssin irrottamista kantajasta ja eksosyklisen amiinin suojaryhmien poistamisessa käytettäviä nukleofiilisiä emäksiä. Fosfaatti- ja emässuojaryhmät kuuluvat samaan ortogonaaliseen ryhmään, kuin 1,3-Ditia-2-yylimetyyli (Dim) **30** kanssa käytetään emästen aminoryhmille Dmoc-suojaryhmää.¹⁰⁰ Myös kiintokantajalinkkeri voidaan valita samaan ortogonaaliseen ryhmään kuuluvaksi kuin Dmoc **29** ja Dim **30**.⁹⁸ Suojaryhmät ja niiden käyttö oligonukleotidisynteesissä on havainnollistettu kuvassa 4.



Kuva 4. Kuvassa on esitetty suojaryhmät 1,3-ditia-2-yylimetoksikarbonyyli (Dmoc) **29** ja 1,3-ditia-2-yylimetyyli (Dim) **30**, sekä niiden käyttökohde oligonukleotideissa.

Dmoc- ja Dim-suojaryhmien poisto tapahtuu kahdessa vaiheessa ja on esitetty kaaviossa 26. Ditiaani hapetetaan ensin NaIO_4 :lla disulfoksidiksi. Seuraavaksi lisätään aniliinia, joka toimii heikkona emäksenä. Aniliini deprotonoi sulfoksidien välissä olevan C-H:n ja suojaryhmä lähtee β -eliminaatioreaktion kautta. Aniliini toimii myös kaappariyhdisteenä ja reagoi muodostuneen Michaelin akseptorin kanssa. Dmoc:n **29** poistossa vapautuu hiilidioksidia.



Kaavio 26. Dmoc- **29** ja Dim-suojaryhmien **30** poistamisen hapetusvaihe NaIO_4 :lla ja β -eliminaatio aniliinilla. Suojaryhmän lähtiessä muodostuu Michaelin akseptori, johon aniliini kaappariyhdisteenä hyökkää.

Ditiaanin hapettuessa H-2 muuttuu huomattavasti happamammaksi. Esimerkiksi Corey-Seebach-reaktioissa¹⁰¹ 1,3-ditiaaneista tehdään nukleofiileja deprotonoimalla ne $n\text{-BuLi}$:lla ja perinteisesti β -eliminoituvat suojaryhmät poistetaan vahvalla emäksellä, kuten DBU:lla. Reaktio-olosuhteita voidaan pitää mietoina, koska hapetuksessa suojattu sokeri- tai emäsosa eivät hapetu ja β -eliminaatioon käytetään heikompaa emästä verrattuna perinteisiin β -eliminoituviin suojaryhmiin.

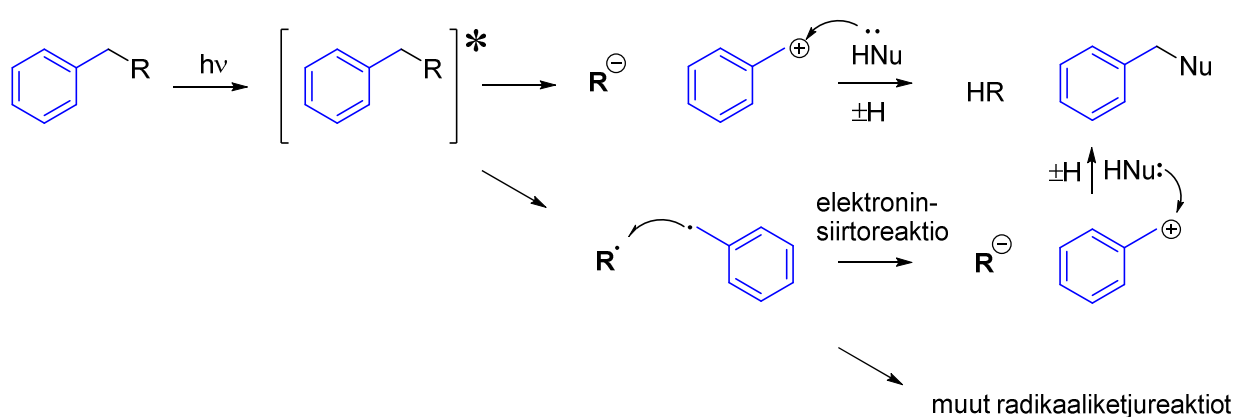
Vaikka suojaryhmän poistossa käytetään hyvinkin mietoja reaktio-olosuhteita kiintokantajan pinnalla tehtävässä oligonukleotidisynteesissä, ditiaanit eivät välttämättä olisi käyttökelpoisia nukleotidimonomeerien synteesiin, joissa on labiili asetaalisuojauks. Dmoc- **29** ja Dim-suojaryhmien **30** poistossa käytetään vesiliuoksia. Sekä hapetusvaiheessa että β -eliminaatiovaiheessa NaIO_4 ja aniliini lisätään vesiliuoksina. Asetaalisuojauks purkautuu hitaasti jo neutraaleissa vesiliuoksissa, joten asetaalit eivät välttämättä kestäisi hapetusvaihetta. Suojaryhmä ei olisi optimaalinen tymidiinimonomeerisynteesissä, jossa yhdisteen hydrofobisuus olisi toivottavaa sen eristämiseksi vesiliuoksista. Suojauksen purkautuminen tapahtuu vesiliuoksessa, joten päädyttäisiin samaan lähtötilanteeseen.

5. Fotolabiilit suojaryhmät

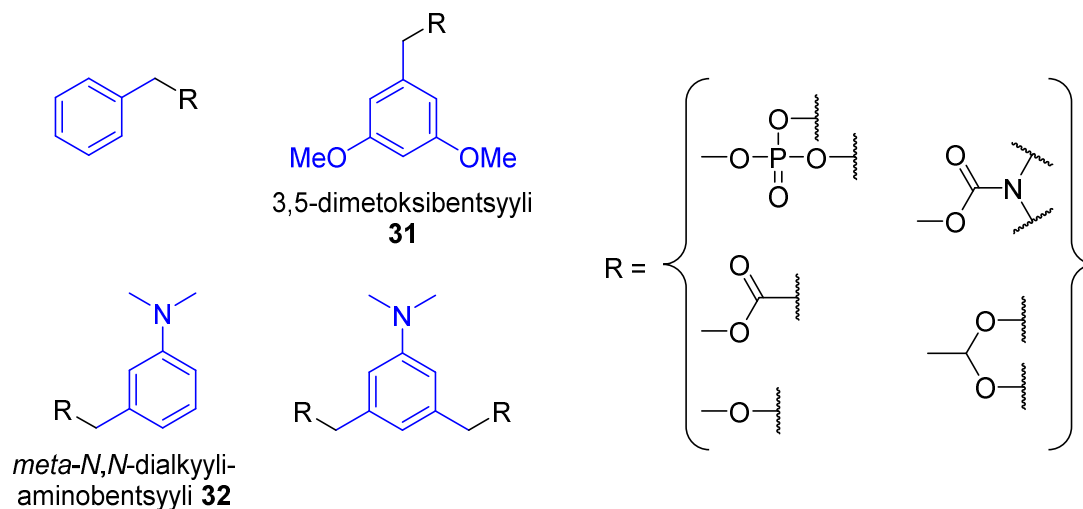
Fotolabiileissa suojaryhmissä on kromofori, joka voi absorboida fotonin ja virittyä. Virittyminen johtaa valoreaktioon ja suojaryhmän irtoamiseen. Yleensä virittymiseen tarvitaan UV-valoa. Suojaryhmän poisto voidaan tehdä käyttäen spektrofotometriä, jolloin reaktiota voidaan myös seurata sen avulla. Tätä menetelmää voidaan käyttää esimerkiksi biotieteellisissä sovelluksissa. Nukleiinihappokemiaan liittyvien synteesisovellusten kannalta olisi edullista, jos valoherkkä suojaryhmä voitaisiin poistaa orgaanisessa liuottimessa.

5.1 Bentsyyliiryhmät

Fosfaatit voidaan suojata fotolabiileilla bentsyyლისillä suojaryhmillä. Bentsyyლისillä suojaryhmillä voidaan fosfaattien lisäksi suojata alkoholeja, dioleja¹⁰², karboksyylihappoja sekä amiineja bentsyylioksikarbonyyli^{103,104}. Jotkin fotolabiileista bentsyyლისistä suojaryhmistä tarvitsevat nukleofiilin avustusta poistuaakseen. Bentsyyლისinen sidos katkeaa sekä hetero- että homolytytisesti. Sidoksen katkaisemiseen tarvitaan UV-valoa aallonpituudella 254-310 nm:ä riippuen bentsyyლისin substituenteista.¹⁰⁵ Heterolytytisesti sidoksen katkeamisessa muodostuu bentsyyლისinen karbokationi, mihin nukleofiileinä toimivat liuottimet hyökkäävät.^{106,107} Homolytytisesti sidoksen katkeamisessa muodostuu radikaalipari. Elektroninsiirtoreaktion kautta radikaaliparista muodostuu bentsyyლისinen kationi ja suojatun molekyylin anioni.¹⁰⁸ Radikaalit voivat käydä läpi myös muita radikaaliketjureaktioita. Sidoksen katkeaminen esitetään kaaviossa 27.



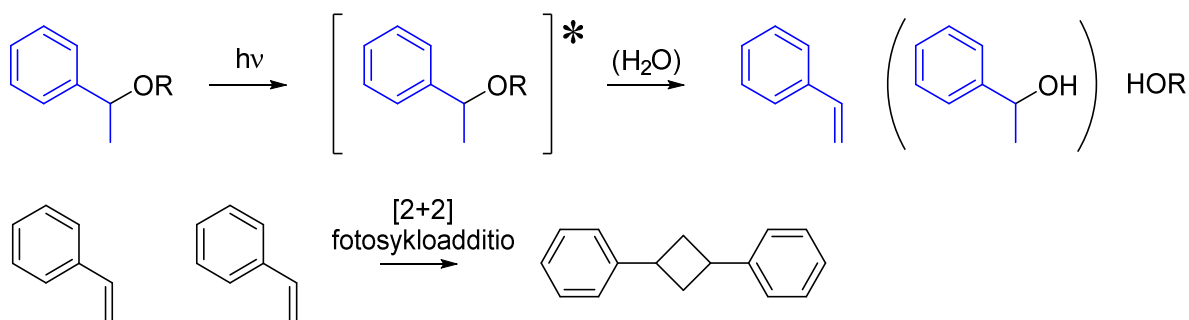
Kaavio 27. Säteiläyttämällä bentsyyლისisuojarjhmää sidos voi katkea heterolytytisesti muodostaen ioniparin tai homolytytisesti muodostaen radikaaliparin. Liuotin voi toimia nukleofiilina ja hyökkää bentsyyლისiseen karbokationiin. Radikaaliparista voi muodostua elektroninsiirtoreaktion kautta ionipari.



Kuva 5. Vasemmalla puolella on bentsyylisiä suojaryhmiä. 3,5-Dimetoksibentsyyli **31** on paljon käytetty suojaryhmä ja *meta*-*N,N*-dialkyyliaminobentsyyli **32** on uudempi suojaryhmä, jolla voidaan suojata kaksi molekyyliä samanaikaisesti. Näillä fotolabiileilla suojaryhmillä voidaan suojata, fosfaatteja, karboksyylihappoja, alkoholeja, amiineja ja dioleja. Amiineja suojataan karbamaatteina. 1,2- ja 1,3-dioleja suojataan asetaaleina.

Elektroneja luovuttavat substituentit bentseenirenkaan *meta*- tai *orto*-asemassa parantavat reaktion saantoa edistämällä radikaalien muodostumista.^{104,106,109} Elektroneja luovuttavat ryhmät saavat myös suojaryhmän absorboimaan valoa pidemmillä aallonpituuksilla. Fosfaatteja on suojattu 3,5-dimetoksibentsyyllillä **31**, joka vapauttaa fosfaatit hyvin saannoin. *Meta*-*N,N*-dialkyyliaminobentsyyllillä **32** on suojattu alkoholeja ja karboksyylihappoja ja ryhmä irtoaa helpommin kuin 3,5-dimetoksibentsyyli, mutta sitä ei ole käytetty fosfaatteihin. Dialkyyliaminosubstituentti aktivoi reaktiota niin paljon, että *meta*-*N,N*-dialkyyliaminobentsyyllillä voidaan suojata kaksi alkoholia.^{105,109}

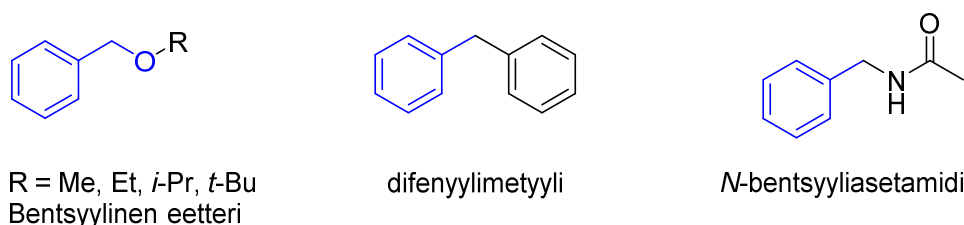
Bentsyyllisen suojaryhmän poistossa muodostuu radikaali tai karbokationi bentsyylliseen asemaan. Radikaalia ja karbokationia voidaan stabiloida lisäämällä metyyliiryhmiä bentsyylliseen kohtaan ja suojaryhmä irtoaa entistä tehokkaammin. 1-Fenyylietyylisuojaryhmän fotolyysi voi mennä toista eliminaatioreaktioreittiä, jossa ei tarvita nukleofiiliä. Eliminaatioreaktiossa muodostuu styreenijohdannaisia, jotka pitkittyneessä säteilytyksessä voivat dimeroitua [2+2] fotosykloaddition kautta. Tarkkaa mekanismia sidoksen katkeamisesta ei tiedetä. Asetonitriilin vesiliuoksissa muodostuu styreenin lisäksi 1-fenyylietanolia, joka on veden nukleofiilisen substituution tuote.^{103,110}



Kaavio 28. 1-Fenyylietyylisuojaryhmän irrottaminen valolla muodostaa vaihtoehtoisia eliminaatioreittejä pitkin styreenijohdannaisia. Jos reaktioseoksessa on vettä, niin muodostuu myös 1-fenyylietanolia. Muodostuneet styreenit eivät ole stabiileja säteilytyksessä, vaan dimereoituvat [2+2] fotosykloaddition kautta.

Bentsyyllisen suojaryhmän poisto voidaan tehdä kuivissa alkoholeissa^{104,106,111}, bentseenissä^{110,111}, asetonitrilissä¹⁰⁶, dioksaanissa^{104,112}, DMF:ssä¹¹⁰, DMSO:ssä¹¹⁰, asetonissa¹¹⁰, THF:ssä¹¹⁰, EtOAc:ssä¹¹⁰ ja heksaanissa¹¹⁰. Reaktio voidaan tehdä myös dioksaanin tai asetonitrilin vesiliuoksissa^{104,110,112}. Valoreaktion on todettu toimivan neutraaleissa ja heikosti happamissa olosuhteissa.¹¹²

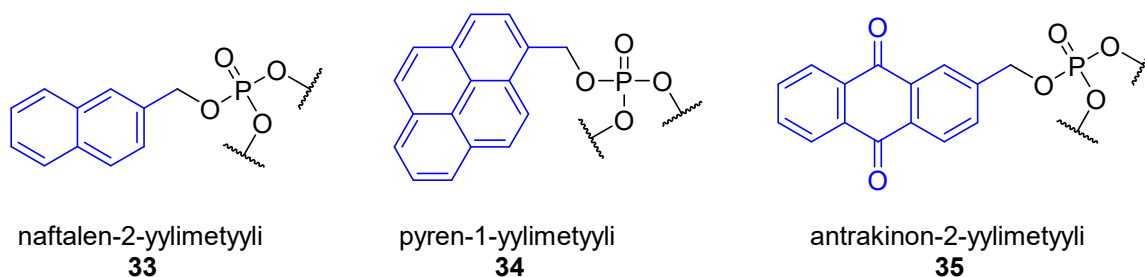
Suojaryhmän poistamisessa alkoholeissa muodostuu bentsyylin ja alkoholin eetteriä.^{106,111} Bentseenissä muodostuu difenyyylimetyyliä.¹¹¹ Kosteassa asetonitrilissä muodostuu *N*-bentsyyliasetamidia.^{104,110,112} Muodostuvat sivutuotteet on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Bentsyylisuojaryhmän poistamisessa muodostuvia sivutuotteita. Muodostuva sivutuote riippuu reaktiossa käytetystä liuottimesta.

Käyttämällä polyaromaattisia yhdisteitä valoreaktion tehokkuus voi parantua ja suojaryhmän virittämiseen voidaan käyttää matalaenergisempää säteilyä. Fosfaattien suojaamiseen on käytetty naftalen-2-yyylimetyyliä¹¹³ **33**, pyren-1-yyylimetyyliä **34** ja antrakininon-2-yyylimetyyliä¹¹³ **35** hyvin tuloksin. Fotolabiileja fosfaatin suojaryhmiä kehitetään pääosin menetelmiksi käytettäväksi biotieteellisissä tutkimuksissa, joten suojaryhmän poisto tehdään usein vesiliuoksissa. Polyaromaattisilla kromoforeilla suojatut fosfaatit eivät liukene hyvin

vesiliuoksiin ilman orgaanisia liuottimia ja saostuvat helposti, mikä huonontaa reaktion saantoa.^{113–116}

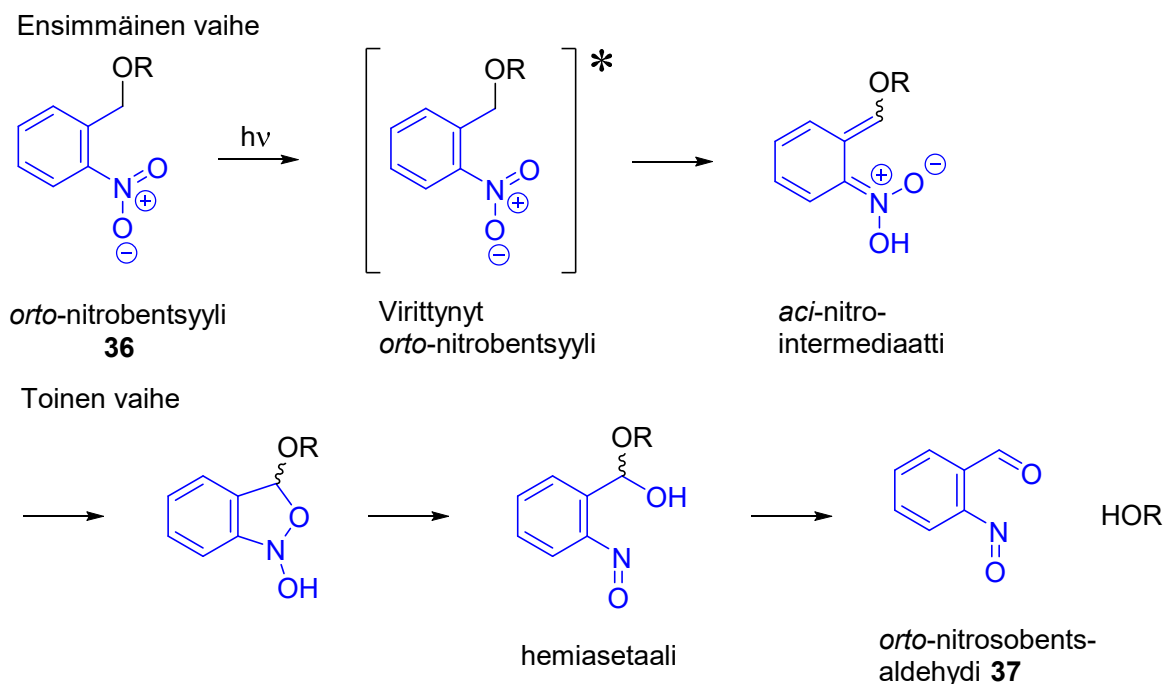


Kuva 7. Polyaromaattisia fotolabiileja suojaryhmiä, joita on käytetty fosfaattien suojaamiseen.

5.2 *orto*-nitrobentsyyli

Käytetyin valoherkkä suojaryhmä organofosfaateille on *orto*-nitrobentsyyli **36**.¹⁰⁷ Suojaryhmä poistetaan säteilyttämällä reaktioluosta UV-valolla. Säteilyttämällä UV-valon aallonpituudella 254 nm *orto*-nitrobentsyylin **36** poistoreaktio on nopeampi kuin 365 nm säteilytyksellä.¹¹⁷

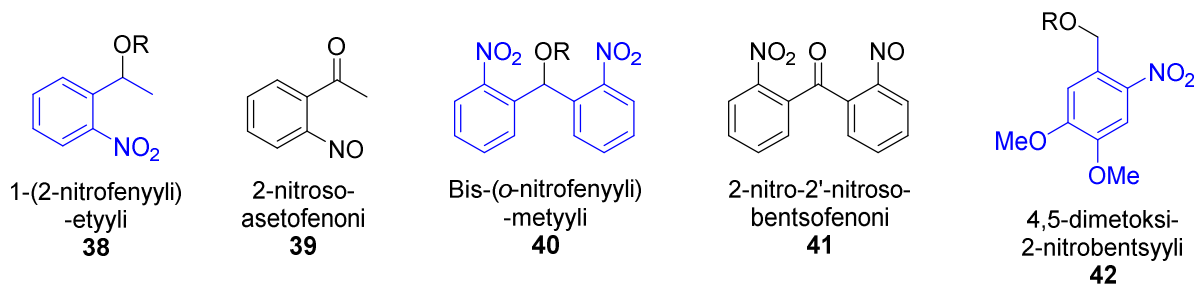
Orto-nitrobentsyyლისuojauksen poistaminen on kaksivaiheinen reaktio ja vaiheet on esitetty kaaviossa 29. Ensimmäisessä vaiheessa virittynyt molekyyli muodostaa *aci*-nitro-intermediaatin. Toisessa vaiheessa *aci*-nitro-intermediaatti syklisoituu ja rengas aukeaa muodostaen nitrosoryhmän ja hemiasetaalin ja lopulta suojattu molekyyli vapautuu. Toinen vaihe ei ole valon katalysoima ja sen nopeus riippuu pH:sta ja liuottimesta. Reaktiot *aci*-nitro-intermediaatista lähtien voivat olla hyvinkin hitaita, ja suojattujen molekyylien vapautuminen kokonaan voi kestää useita tunteja. Suojauksen poistumista ei siksi voi luotettavasti seurata mittaamalla *orto*-nitrobentsyylin absorptiota.^{105,116,118}



Kaavio 29. *Ortho*-nitrobenssyyli-ryhmän poistamisen kaksi vaihetta. Ensimmäinen vaihe on valon katalysoima, mutta toinen vaihe ei ole.

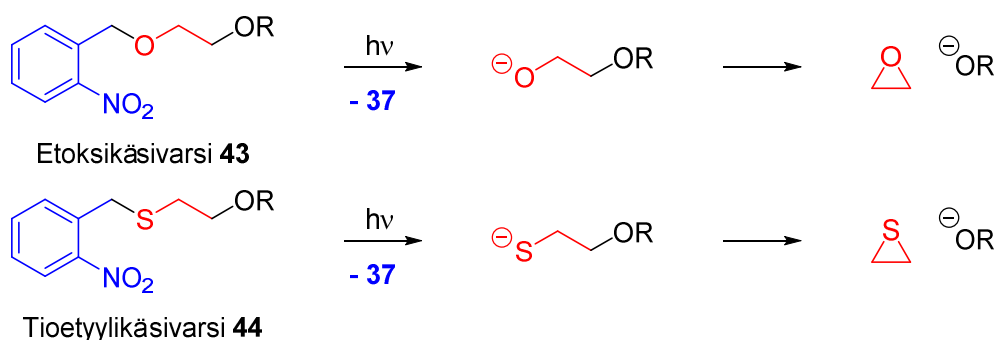
Suojaryhmän poistamisessa muodostuu sivutuotteena *ortho*-nitrosobentsaldehydiä **37**, joka on hyvin reaktiivinen elektrofiili. *Ortho*-nitrosobentsaldehydi voi reagoida edelleen vapautuneen tuotteen kanssa pienentäen saantoa.¹¹⁹ Nitrosobentsaldehydin aiheuttamia sivureaktioita voidaan minimoida käyttämällä kaappariyhdisteitä, jotka reagoivat aldehydin kanssa estäen tuotteen sivureaktiot. Kaapparina voidaan käyttää mm. polymeeriin sidottua hydratsiinia¹¹⁹ tai semikarbatsidia¹¹⁴.

Kaappariyhdisteiden käyttämisen sijaan voidaan myös muuttaa suojaryhmän rakennetta siten, että valoreaktion sivutuote on vähemmän reaktiivinen. Suojaryhmään voidaan lisätä metyyli-ryhmä bentsyyliin, jolloin suojaryhmä on 1-(2-nitrofenyyli)-etyyli **38**. Suojaryhmän poistossa muodostuu 2-nitrosoasetofenoni **39**, joka on 2-nitrosobentsaldehydiin verrattuna vähemmän reaktiivinen.¹²⁰ Pidemmän synteesireitin kautta voidaan valmistaa bis-(*ortho*-nitrofenyyli)-metyyliä **40**, jonka valoreaktio on vielä herkempi ja sivutuotteena muodostuu 2-nitro-2'-nitrosobentsofenonia **41**.¹²¹ Lisäämällä elektroneja luovuttavia tai vastaanottavia ryhmiä bentseenirenkaaseen, kuten kaksi metoksi-ryhmää 4,5-dimetoksi-2-nitrobenssyyliin **42**, saadaan valoreaktion virittymisaallonpituutta muutettua.¹¹⁷ Edellä mainitut *ortho*-nitrofenyylijohdannaiset esitetään kuvassa 8.



Kuva 8. Kuvassa on *orto*-nitrofenyylijohdannaisia ja niiden hajoamistuotteita. Rakennemuutokset muokkaavat ominaisuuksia ja mahdollistaa niiden käytön erilaisissa sovelluksissa.

Orto-nitrobentsyylin labiilisuuteen vaikuttaa se, missä suojaryhmä on kiinni. Suojaryhmän irtoamista voidaan nopeuttaa lisäämällä suojaryhmään etoksi- tai tioetyylikäsivarsi, kuten kaaviossa 30. Etoksikäsivarresta **43** muodostuu oksiraanisivutuotetta ja tioetyylikäsivarresta **44** etyleenisulfidia. Käsivarren sisältävien suojaryhmien syklistoituminen on irtoamisen rajoittava tekijä. Reaktionopeutta voidaan lisätä lämpötilaa kasvattamalla. Käsivarsi **44** ei ole stabiili happamissa olosuhteissa, joissa poistetaan oligonukleotideissa yleisesti käytetty DMTr.¹¹⁷

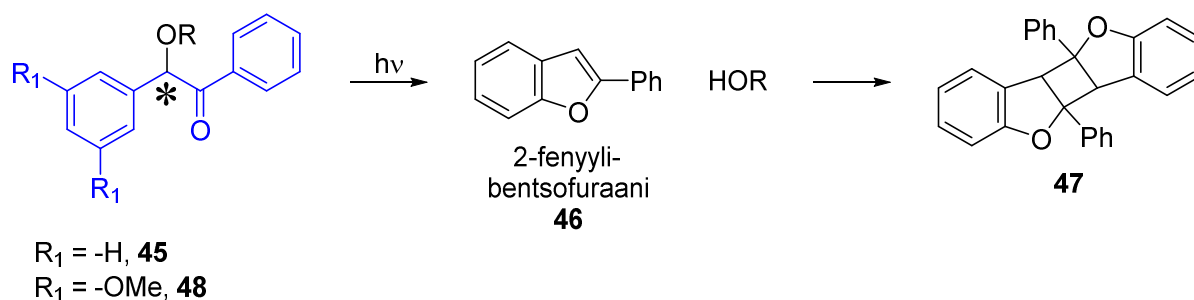


Kaavio 30. *O*-nitrobentsyyliin liitetty etoksi- tai tioetyylikäsivarsi. Käsivarren syklistoituminen on reaktiketjun rajoittava tekijä ja siinä muodostuu oksiraania tai etyleenisulfidia.

5.3 Bentsoiini

Bentsoiini **45** on fotolabiili suojaryhmä, jolla voidaan suojata fosfaatteja. Bentsoiinin **45** virittyessä tapahtuu valokatalyyttinen reaktio, jossa muodostuu 2-fenyylibentsofuraania **46**.^{106,122,123} Bentsoiinin **45** etu paljon käytettyyn *orto*-nitrobentsyyliin **36** verrattuna on se, että muodostuva bentsofuraani **46** ei ole yhtä reaktiivinen kuin nitrosoyhdisteet. Bentsoiini **45** on kiraalinen molekyyli ja voi muodostaa diastereomeeriseoksia, kun sillä suojataan kiraalisia yhdisteitä. Lukuisat diastereomeerit voivat hankaloittaa karakterisointia. Tietyn bentsoiinistereoisomeerin ja suojattavan yhdisteen enantiomeerin käyttämisestä on suositeltu, jos

suojattavassa molekyylissä on asymmetriakeskus, koska bentsoiinin asymmetrisessä synteesissä ei ole montaa vaihetta.¹²²

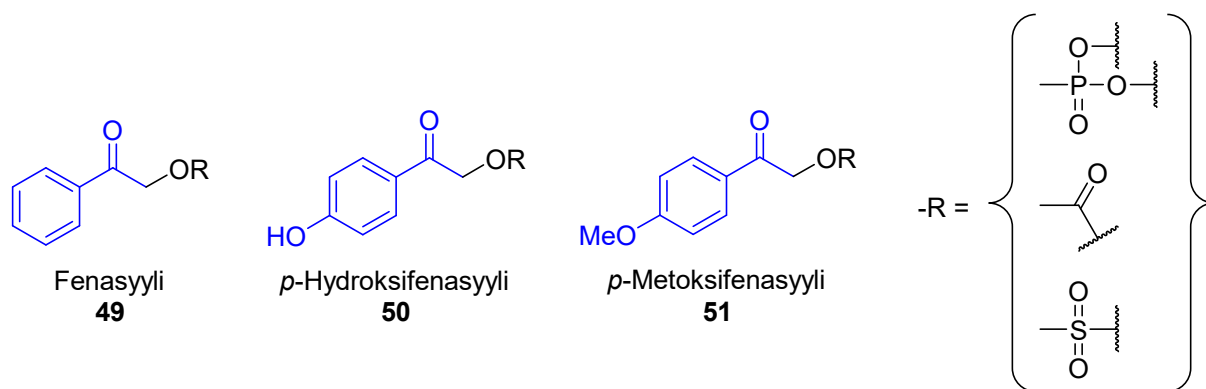


Kaavio 31. Bentsoiinisuojarahmā **45** irrottamisessa valolla muodostuu 2-fenyylibentsofuraania **46**. Jos bentsoiinin poistamiseen käytetään liian energistä UV-valoa, muodostuu **46**:n dimeeri **47**. Suojaryhmä irtoaa helpommin lisäämällä metoksiryhmiä *meta*-asemaan bentsyyliiseen hiileen nähden, 3,5-dimetoksibentsoiini **48**. Bentsoiinin asymmetrinen hiili on merkitty tähdellä (*).

Bentsoiinisuojarahmā poistetaan käyttämällä UV-valoa aallonpituudella 350 nm.^{122,123} Suojaryhmä lohkeaa myös lyhyemmillä aallonpituuksilla, kuten 300 nm:llä, mutta korkeaa energisempi UV-valo aiheuttaa bentsofuraanin **46** dimeroitumista.¹²³ Bentsoiinista voidaan tehdä helpommin irtoavia johdoksia lisäämällä aromaattiseen renkaaseen elektroneja luovuttavia metoksiryhmiä *meta*-asemaan bentsyyliiseen alkoholiin nähden, kuten 3,5-dimetoksibentsoiinissa **48**.^{121,122,124} Bentsoiinisuojarahmān poisto valolla ei vaadi nukleofiiliä, joten ryhmä voidaan poistaa monissa orgaanisissa liuottimissa, kuten bentseenissä, metanolissa tai asetonitrilissä, ilman veden läsnäoloa.^{106,123} Fotokatalyyttinen intramolekulaarinen reaktio on kuitenkin nopeampi alemmassa pH:ssa vesiliuoksissa.¹²³

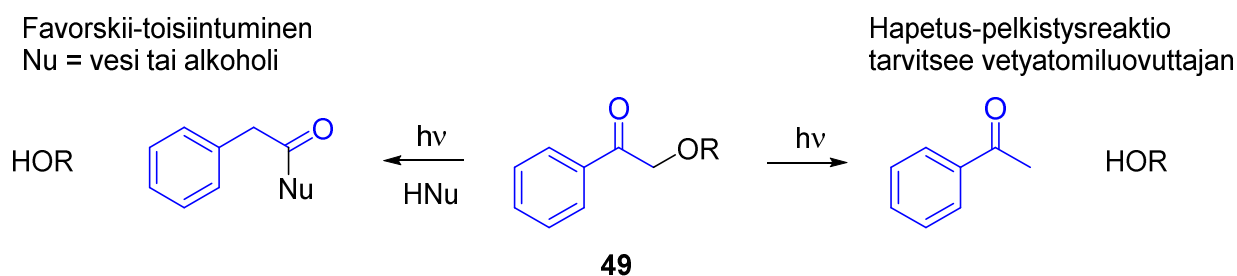
5.4 Fenasyylisuojarahmät

Fenasyylisuojarahmā **49** on bentsoiinin kaltainen α -fenyyliketoni, joka virittyy aallonpituudella 280-350 nm.^{125,126} Käytetyimmät substituentit bentseenirekaassa ovat elektroneja luovuttavat hydroksyyli- tai metoksiryhmä *para*-asemassa. *Para*-hydroksifenasyyli **50** lohkeaa näistä nopeimmin, mutta on vesiliukoinen.^{125,127} Suojaryhmää käytetään fosfaattien suojaamisen lisäksi karboksyyli-^{127,128} ja sulfonylihapoille¹²⁹. Yleisimmät fenasyylisuojarahmät esitetään kuvassa 9.

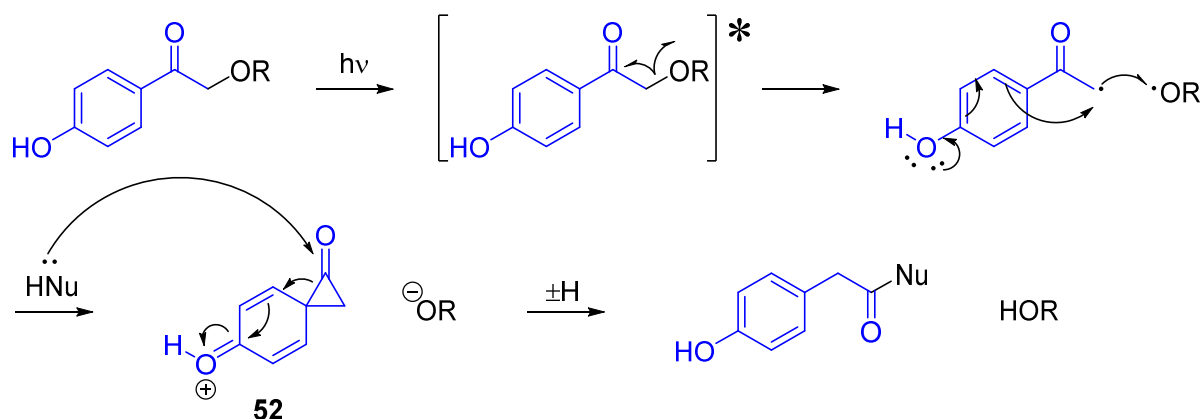


Kuva 9. Kuvassa on esitettyä yleisimmät fenasyylisuojarahmät: fenasyyli **49**, *p*-hydroksifenasyyli **50**, *p*-metoksifenasyyli **51**. Fenasyylisuojarahmillä voidaan suojata fosfaatteja, karboksyylihappoja ja sulfonylihappoja.

Fenasyyli **49** voi lohjeta suojatusta molekyylistä kahden vaihtoehtoisen reaktioketjun kautta, kuten kaaviossa 32 on esitetty.^{125,130} Ensimmäisessä reaktioketjussa valo aiheuttaa fenasyyliryhmän Favorskii-toisiintumisen ja nukleofiilinä toimiva liuotin aukaisee muodostuneen syklopropanoni-intermediaatin **52**. Veden hyökätessä muodostuu 2-fenyylietikkahappoa ja alkoholin hyökätessä muodostuu vastaava esteri.^{123,125} Favorskii-toisiintumisen mekanismi näytetään kaaviossa 33. Vesiliuoksessa valoreaktio nopeutuu, jos se tehdään inertissä ilmakehässä, sillä happi todennäköisesti hidastaa reaktiota.^{129,131} Toinen reaktio on hapetus-pelkistysreaktio¹²⁸, jossa fenasyyliryhmä pelkistyy asetofenoniksi ja liuotin tai lisätty vetyatomiluovuttaja hapettuu.¹²³ Toinen reaktioketju on esitettyä kaaviossa 34. *Para*-asemassa hydroksyyli-ryhmä suosii toisiintumista^{127,131} ja metoksiryhmä hapetus-pelkistysreaktiota^{128, 123}.

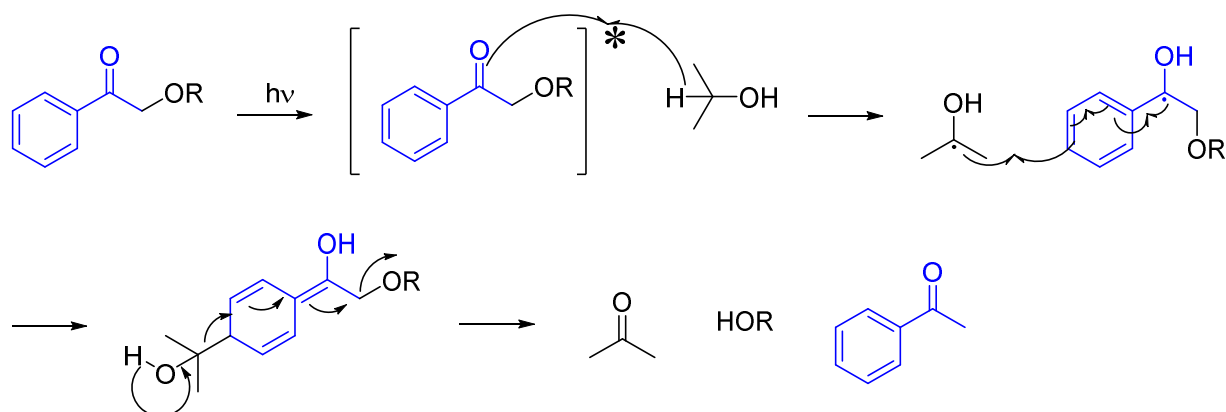


Kaavio 32. Fenasyylisuojarahmä **49** poistuu Favorskii-toisiintumisen tai hapetus-pelkistysreaktion kautta. Favorskii-toisiintumisessa tarvitaan nukleofiili, joka voi olla liuotin. Hapetus-pelkistysreaktiossa tarvitaan liuotin tai reagenssi, joka voi toimia vetyatomiluovuttajana.



Kaavio 33. *p*-Hydroksifenasyylisuojaryhmän Favorskii-toisiintumisen reaktiomekanismi. Radikaalireaktioiden jälkeen muodostuneen syklopropanoni-intermediaattiin **52** hyökkää nukleofiili, joka aukaisee rengasrakenteen.

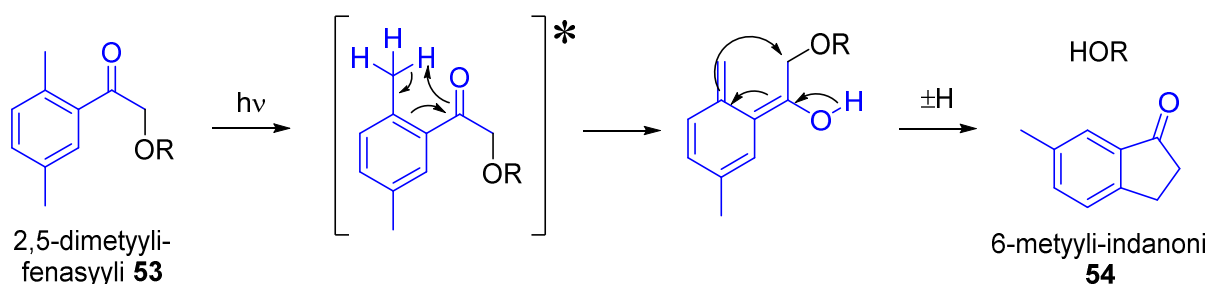
Suojaryhmän poistamiseen käytettyjä liuottimia ovat: metanoli^{123,125}, etanoli^{123,128}, isopropanoli, *tert*-butanoli^{123,125}, dioksaani¹²⁸, asetonitriili^{131,132}, vesi^{125,131} ja bentseeni¹³². Sekä metanolissa että *tert*-butanolissa tehdyt valoreaktiot suojatuille fosfaateille *p*-hydroksi- tai *p*-metoksisubstituentilla muodostuu toisiintuneita ja pelkistyneitä sivutuotteita.¹²⁵ Metanolissa tapahtuu pääosin pelkistyminen.¹²⁵ Kuivassa asetonitriilissä suojaryhmän lohkeaminen johtaa tuoteseokseen, joissa tuotteiden molekyylimassat ovat suuria.¹³¹ Asetonitriilissä reaktio voidaan ohjata hapetus-pelkistysreaktioksi lisäämällä lisäaineita tai Favorskii-toisiintumiseksi käyttämällä vähintään 5% vettä.¹³¹ Valoreaktio vedessä tai orgaanisissa liuottimissa, joissa on suuri määrä vettä, antaa enemmän toisiintumistuetta. Reaktio ei etene bentseenissä, mutta vetyatomiluovuttajan lisäämisen jälkeen alkaa heti muodostumaan asetofenonituotetta suojaryhmän irtoamisesta.¹³²



Kaavio 34. Fenasyylin hapetus-pelkistysreaktioketju. Fenasyylisuojarahyhmä pelkistyy asetofenoniksi ja isopropanoli, joka toimii vetyatomiluovuttajana, hapettuu asetoniksi.

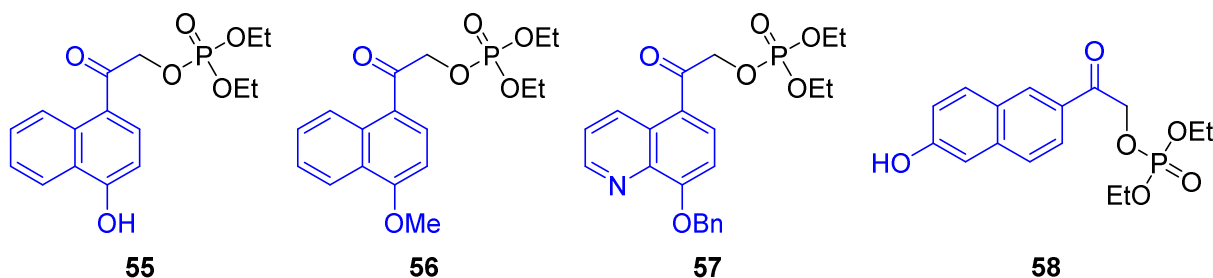
Hapetus-pelkistysreaktio vaatii vetyatomiluovuttajan, joka voi olla liuotin tai lisäaine.¹³² Liuottimista vetyatomiluovuttajia ovat metanoli, etanoli, isopropanoli ja dioksaani. Osa reaktioon muuten soveltuvista liuottimista, kute asetonitrili, ei pysty osallistumaan aktiivisesti reaktioon ja tällöin lisäaineena voidaan käyttää esimerkiksi sykloheksadi-1,4-eeniä, tri-BuSnH:ä, isopropanolia tai kumeenia^{128, 132} Fenasyylin lohkeaminen tapahtuu todennäköisesti radikaalimekanismin kautta, joten stabiloimalla muodostunutta radikaalia reaktio voisi nopeutua. Radikaali stabiloidaan lisäämällä metyyliiryhmä bentsyyliiseen asemaan. Muodostuneen α -Metyylifenasyylin lohkeaminen on yhtä nopeaa kuin p-metoksifenasyylin.¹²⁸

2,5-dimetyylifenasyyli **53** toisin kuin edellä mainitut fenasyylit voi valoreaktiossa syklisoitua 6-metyyli-indanoniksi¹²⁹ **54**. Valoreaktiossa muodostuu pelkistystuotteena pieni määrä asetofenonia. Metanoli on havaittu erinomaiseksi liuottimeksi syklisoinnille, mutta reaktio onnistuu myös bentseenissä. Syklisoituminen on esitetty kaaviossa 35.¹²⁹ Valon aiheuttamaa enolisointia on hyödynnetty myös muissa suojarahymissä, mutta niitä ei ole käytetty fosfaattien suojaamiseen.¹¹⁶



Kaavio 35. 2,5-Dimetyylifenasyyli **53** vapauttaa suojatun molekyylin syklisoitumalla 6-metyyli-indanoniksi **54**.

Fenasyylisuojaryhmää on pyritty parantamaan lisäämällä yksi aromaattinen rengas. Tuloksena suojarahmä virittyy tehokkaammin matalaenergisemmällä UV-valolla. Näitä fenasyylijohtannaisia on kokeiltu pääasiassa metanolissa, jossa on 1 % vettä. Hydroksiryhmällä **55** substituoitu osoittautui parhaimmaksi suojarahmäehdokkaaksi. Metoksyryhmällä **56** substituoitu irtoaa heikommin. Kinoliini **57** tai 2,6-substituoitu naftaleeni **58** irtosivat huonosti ja muodostivat paljon erilaisia sivutuotteita eivätkä soveltuneet suojarahmiksi.¹²⁶



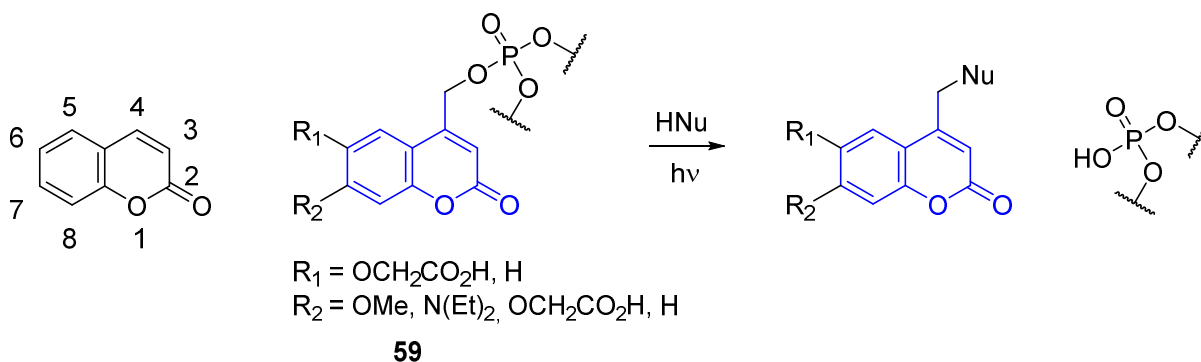
Kuva 10. Fenasyylin johdannaisia, joihin on lisätty yksi aromaattinen rengas lisää. **55** on paras näistä vaihtoehdoista. **56** on vielä käyttökelpoinen suojarahmä. **57** ja **58** eivät sovellu suojarahmiksi.

5.5 Heterosykliset kromoforit

Heterosyklisissä kromoforeissa on usein enemmän kuin yksi rengasrakenne ja karbonyyliryhmä. Suojattava molekyyli on kromoforissa kiinni metyleeniryhmän välityksellä. Kehitetyt heterosyklit absorboivat matalaenergisempää säteilyä ja virittyvät tehokkaammin. Heterosyklisiä kromoforeja, joita on käytetty fotolabiileina suojarahminä fosfaateille ovat kumarinyylimetyylijohtannaiset^{106,113,133,134} **59**, 8-bromi-7-hydroksikinolin-2-yylimetyyli¹³⁵ **60** ja 3-fenyyli-*S,S*-dioksiditiokromon-2-yylimetyyli¹³⁶ **61**. Suojattavan molekyylin irottamiseksi suojarahmästä tarvitaan nukleofiili kumanriinyylimetyylin ja

hydroksikinyylimetyylin tapauksessa. Tiokromonyylimetyylisuojarahmä syklistoituu intramolekulaarisesti, eikä sen irrottamisessa tarvita ulkopuolista nukleofiiliä.

Kumariinijohdannaiset **59** reagoivat monien nukleofiilien kanssa irrottaen fosfaatin säteilytyksen jälkeen.¹⁰⁶ Nukleofiileinä voivat toimia pienmolekyylit tai proteiinit: vesi^{113,133,134}, metanoli, piperidiini, kysteiini, tyrosiini, alfa-kymotrypsiini, histamiini *N*-metyylitransferaasi.¹⁰⁶ Kumariinijohdannaisen tehokkaaseen irrottamiseen tarvitaan säteilytystä aallonpituudella 300-405 nm ja aallonpituusoptimi riippuu kumariinissa olevista substituenteista.^{106,133,134} Virittyminen tapahtuu matalaenergisellä säteilyllä. Kumariineja käytetään paljon fosfaattien nopeaan vapauttamiseen vesiliuoksissa ja soluissa, koska ne ovat stabiileja käyttöolosuhteissa ja vapauttavat fosfaatin tehokkaasti.¹³⁴

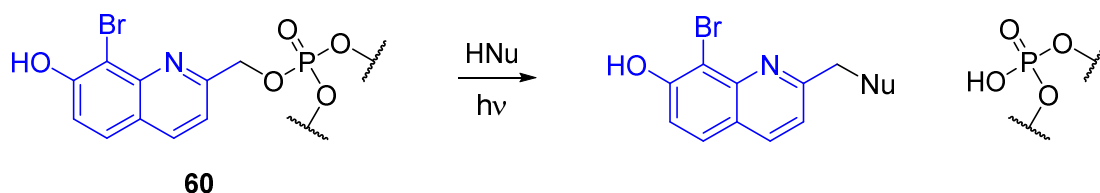


Kaavio 36. Vasemmalla on esitetty kumariinin hiilten numerointi. Oikealla on esitetty fosfaatin vapautuminen kumariinista **59** nukleofiilin avulla. Kaaviossa näkyy myös yleisiä substituentteja, joita käytetään kumariinisuojarahmän kanssa.

Fosfaatti on kiinni kumariinissa 4-hiilen metyleeniryhmän välityksellä. Kumariinien ominaisuuksia säädellään lisäämällä substituentteja 6- ja 7-hiileen. Substituenteilla voidaan säädellä kumariinin liukoisutta ja virittymisaallonpituutta. Sekä elektroneja luovuttavat että puoleensavetävät substituentit nostavat virittymisaallonpituutta. Erityisesti 7-dietyyliamino substituentilla voidaan irrottaa fosfaatti kumariinista jo näkyvällä valolla.¹³³ Muita käytettyjä substituenteja ovat 7-metoksi, 7-karboksimetoksi ja 6, 7-biskarboksimetoksi.^{106,133} 7-Metoksikumarin-4-yylimetyylin esterit cAMP:n ja cGMP:n kanssa ovat niukkaliukoisia veteen.¹³³

8-Bromi-7-hydroksikinolin-2-yylimetyyliä **60** voidaan käyttää fosfaattien, karboksyylihappojen ja diolien suojaamisessa. Suojauksen poistamiseen tarvitaan nukleofiili.

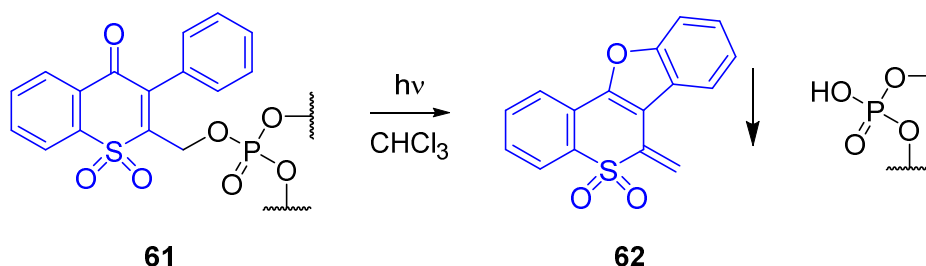
Kromofori virittyy aallonpituudella 370 nm. Suojaus voidaan poistaa puskuroiduissa vesiliuoksissa ja asetonitrilissä.¹³⁵



Kaavio 37. Fosfaatin irrottaminen 8-bromi-7-hydroksikinolin-2-yylimetyylistä **60** nukleofiilillä valon avulla.

3-fenyyl-*S,S*-dioksidiokromon-2-yylimetyyllillä **61** voidaan suojata fosfaatteja. Suojaryhmä voidaan poistaa kloroformissa UV-valolla, jonka aallonpituus on vähintään 280 nm.

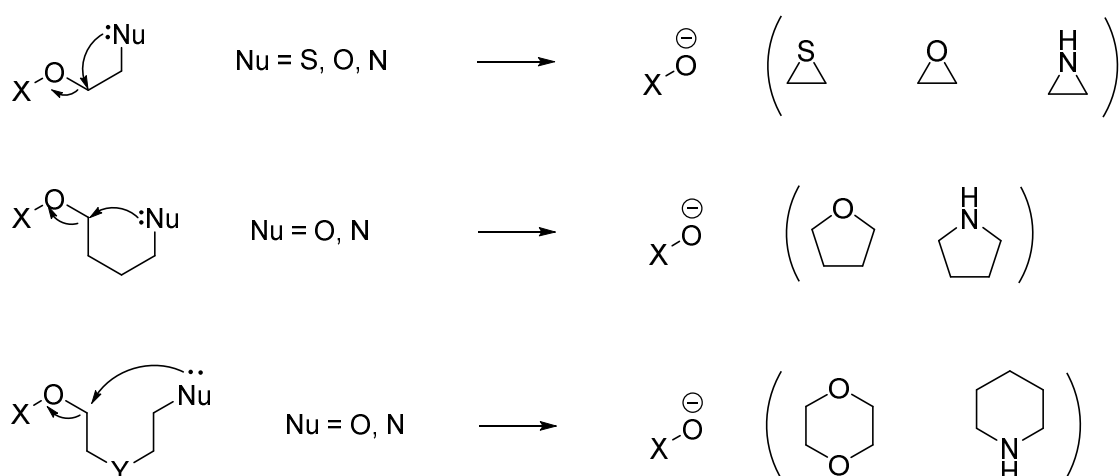
Suojaryhmä saadaan irrotettua 365 nm säteilyllä. Suojaryhmän irrottamiseen ei tarvita nukleofiiliä, vaan valon virittämä kromofori syklistoituu intramolekulaarisesti ja poistuu tetrasyklisenä reaktiotuotteena **62**. Suojaryhmän irrottamista voidaan seurata fluoresenssi spektroskopiolla, koska reaktiotuotteella on vahva fluoresenssi 440 nm:ssä, eli aallonpituudella, joka eroaa alkuperäisen kromoforin fluoresenssista. Reaktiotuote **62** saostuu kloroformista kiteinä sitä mukaan, kun sitä muodostuu.¹³⁶



Kaavio 38. 3-Fenyyl-*S,S*-dioksidiokromon-2-yylimetyyllillä **61** suojattu fosfaatti voidaan irrottaa valon avulla kloroformissa. Fosfaatin irrotaessa muodostuu tetrasyklinen sivutuote **62**, joka kristallisoituu kloroformissa.

6. Syklisaatiolla irtoavat suojaryhmät

Syklode-esterifikaatioreaktiossa tapahtuu intramolekulaarinen syklisoituminen, jossa lähtevästä ryhmästä kahden, neljän tai viiden sidoksen päässä oleva nukleofiilinen atomi hyökkää. Reaktiossa vapautuu suojattu molekyyli ja muodostuu kolmi-, viisi- tai kuusirenkainen tuote. Fosfaatin tiedetään olevan hyvä lähtevä ryhmä intramolekulaarisessa reaktiossa ja ryhmän avulla voidaan valmistaa kolmi-, viisi- ja kuusirenkaisia heterosyklisiä tuotteita.^{117,137–139} Syklisoitumisreaktio havaitaan myös aminoetanolilla, -butanolilla tai -pentanolilla substituoiduilla vetyfosfonaateilla.^{140,141}



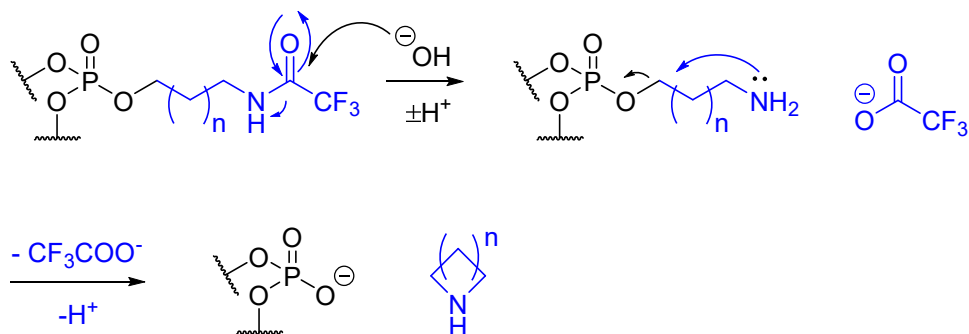
Kaavio 39. Syklisointireaktioita, joissa voi muodostua kolmi-, viisi- ja kuusirenkaisia heterosyklejä. X voi olla fosfaatti tai vetyfosfonaatti ja Y on O tai CH₂.

Syklisaatioreaktiolla irrotettavien suojaryhmien suunnittelussa tärkeintä on asettaa nukleofiili oikealle etäisyydelle. Neljän sidoksen päässä oleva nukleofiili syklisoituu nopeasti viisirenkaaksi. Syklisoitumisreaktio usein hidastuu huomattavasti, jos nukleofiili sijaitsee yhden sidoksen lähempänä tai kauempana.^{142–144}

6.1 *N*-Trifluoroasetyyliaminoalkyyli ryhmä

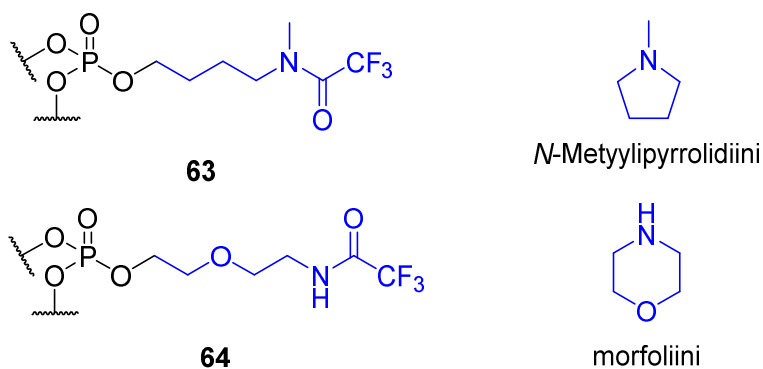
Trifluoroasetyloituja aminobutyyli- tai aminopentyyli ryhmiä käytetään fosfodiesterien suojaryhminä. Suojaryhmän irrottaminen on kaksivaiheinen. Trifluoroasetyyliamidi hydrolysoidaan ammoniakin vesiliuoksella. Seuraavassa vaiheessa aminoryhmä hyökkää hiileen, jossa fosfaatti on kiinni. *N*-Trifluoroasetyyliaminobutyyli ryhmästä muodostuu pyrrolidiiniä ja *N*-Trifluoroasetyyliaminopentyyli ryhmästä muodostuu piperidiiniä. Aminobutyylin syklisointi on nopeaa ja se tapahtuu huoneenlämmössä. Aminopentyyli ryhmän

syklisaatioreaktio on niin hidas että, suojattu fosfaatti voidaan eristää huoneenlämmössä. Aminopentyylin syklisoitumista voidaan nopeuttaa lämmittämällä reaktioseosta.¹⁴⁵



Kaavio 40. *N*-trifluoroasetyyliaminoalkyyli­ryhmän kaksivaiheinen irrottaminen. Ensimmäisessä vaiheessa amidiryhmä hydrolysoidaan ja toisessa vaiheessa tapahtuu syklisointi. Kaaviossa n on 2 tai 3.

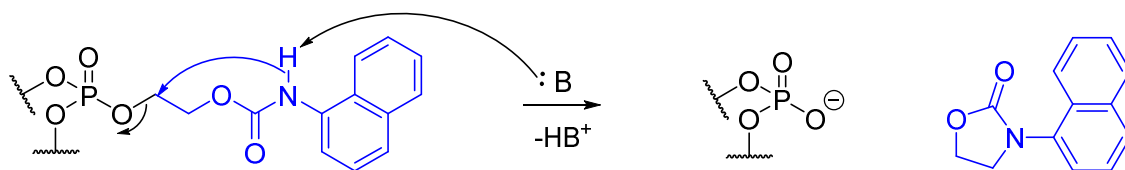
Suojaryhmästä on tehty kaksi johdannaista: 4-[*N*-metyyli-*N*-(2,2,2-trifluoroasetyyli)amino]butyyli­ryhmä **63** ja 2-[2-[*N*-(trifluoroasetyyli)amino]etyylioksi]etyyli­ryhmä **64**. Edellä mainitut johdannaiset irtoavat saman kaltaisten reaktiomekanismien kautta. **63**:n irrotuksessa muodostuu *N*-metyy­lipyrrolidiiniä ja **64**:n tapauksessa morfoliinia. **63**:n hydrolyysistä vapautuva *N*-metyyliaminobutyyli syklisoituu nopeammin, kuin aminobutyyli­ryhmä. **64**:n syklisointireaktio hydrolyysin jälkeen vaatii lämmittämisen. *N*-Trifluoroasetyylialkyyli­ryhmät ovat inerttejä vedettömissä vahvasti emäksisissä olosuhteissa.¹⁴⁵



Kuva 11. 4-[*N*-metyyli-*N*-(2,2,2-trifluoroasetyyli)amino]butyyli­ryhmä **63** ja 2-[2-[*N*-(trifluoroasetyyli)amino]etyylioksi]etyyli­ryhmä **64** sekä niiden irrottamisesta fosfaatista muodostuvat tuotteet.

6.2 2-(Aryylikarbamoyylioksi)etyyliryhmä

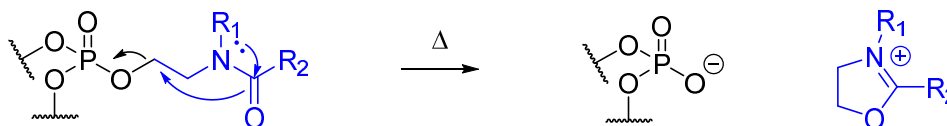
2-(Aryylikarbamoyylioksi)etyyliryhmää voidaan käyttää fosfodiesterien emäslabiilina suojaryhmänä. Suojaryhmä irtoaa intramolekulaarisella syklisaatioreaktiolla. Reaktiossa muodostuu 3-aryyli-1,3-oksatsolidin-2-onia. Fenyylä, 4-dimetyyliaminofenyylä ja 1-naftyyliä on tutkittu aryylyliryhminä. Naftyylyliryhmää käytetään suojaryhmässä, koska se on stabiili pitkäaikaisessa säilytyksessä ja syklisaatioreaktion reaktioaika on lyhyt. Suojaryhmä irrotetaan fosfotriesteristä ammoniakkin vesi-etanoliliuoksella. Reaktiota voidaan nopeuttaa lämmittämällä.¹⁴⁶



Kaavio 41. Reaktiomekanismi 2-(1-naftyylikarbamoyylioksi)etyyliryhmän poistamisesta.

6.3 2-Amidietyyliryhmä

2-bentsamidietyyliryhmillä¹⁴⁷ ja 2-*N*-formyyliaminoetyyliryhmillä¹⁴² voidaan suojata fosfaatteja. Syklisaatioreaktiossa karbonyyliryhmän happi toimii nukleofiilina ja reaktio tehdään lämmittämällä suojattu yhdiste neutraalissa tai emäksisessä liuoksessa. Suojaryhmän poistossa muodostuu 2-oksatsoliinijohdannaisia, jotka voivat hydrolysoitua tai reagoida nukleofiilien kanssa ja mahdollisesti muodostaa useita erilaisia lopputuotteita.

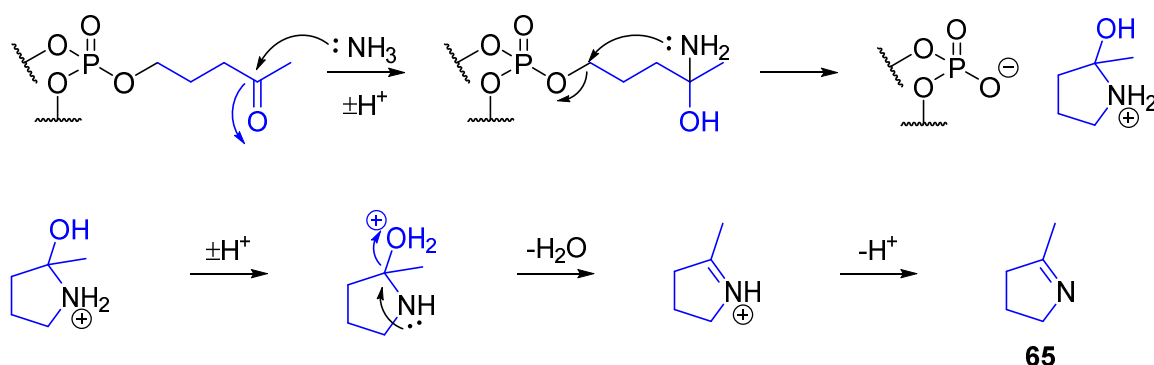


Kaavio 42. Reaktiomekanismi 2-amidietyyliryhmien syklisaatioreaktioista. 2-bentsamidietyyliryhmissä R_1 on H, metyyli- tai isopropyyliryhmä ja R_2 on fenyylä tai 4-substituoitu fenyylä. 2-*N*-formyyliaminoetyyliryhmissä R_1 on H tai metyyli- tai isopropyyliryhmä ja R_2 on H.

Syklisaatioreaktio on nopeampaa tertiäärisillä amideilla.^{142,147} Elektroneja luovuttavat substituentit *para*-asemassa 2-bentsamidietyyliryhmissä nopeuttavat myös syklisaatioreaktiota.¹⁴⁷ 2-Bentsamidietyyliryhmien syklisaatioreaktio tehtiin ammoniakkin vesiliuoksessa huoneenlämmössä tai lämpötilassa 55 °C.¹⁴⁷ 2-*N*-formyyliaminoetyyliryhmien poisto tehdään neutraalissa puskuroidussa vesiliuoksessa lämpötilassa 90 °C.¹⁴²

6.4 4-Oksopentyyliryhmä

Fosfaatit voidaan suojata 4-oksopentyyliryhmällä. Suojaryhmä voidaan poistaa neutraalissa vesiliuoksessa tai emäksisissä olosuhteissa ammoniakilla tai metyyliamiinilla. Neutraaleissa olosuhteissa suojaryhmän irrottamisesta on tutkittu vain vapautuneet nukleotidit. Muita lopputuotteita ei ole karakterisoitu eikä syklisaatioreaktion reaktiomekanismia ole tutkittu tarkemmin. Suojaryhmän poistaminen ammoniakilla tapahtuu todennäköisesti hemiaminaalivälivaiheen kautta, koska 2-metyyli-1-pyrroliinia **65** voitiin eristää reaktion lopussa.¹⁴⁸

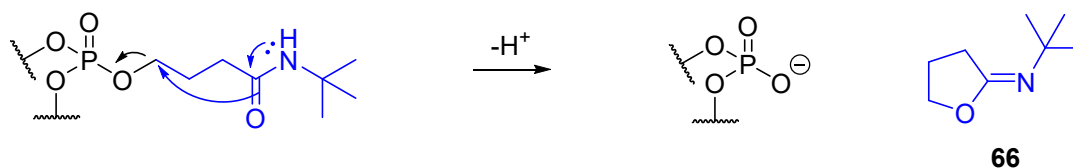


Kaavio 43. Mahdollinen reaktiomekanismi 4-oksopentyyliryhmän irrottamiselle ammoniakilla ja 2-metyyli-1-pyrroliiniin **65** muodostumiselle.

Neutraalissa puskuriliuoksessa suojaryhmän irrottaminen vaatii $90\text{ }^\circ\text{C}$:n lämpötilaa.¹⁴² Suojaryhmän irrottaminen emäksisissä olosuhteissa tehdään paineastiassa ammoniakki- tai metyyliamiinikaasulla huoneenlämmössä tai väkevällä ammoniakin vesiliuoksella lämpötilassa $55\text{ }^\circ\text{C}$.¹⁴⁸

6.5 3-(*N*-*tert*-butyylikarboksiamidi)-1-propyyliiryhmä

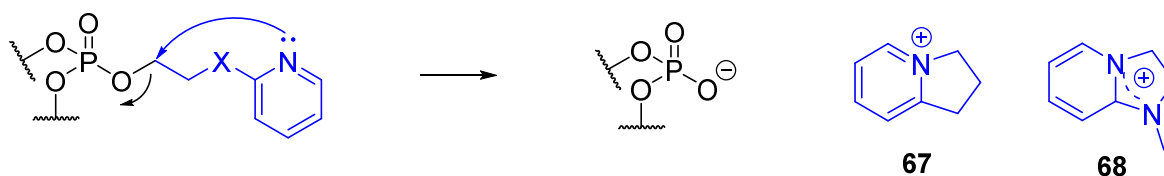
3-(*N*-*tert*-butyylikarboksiamidi)-1-propyyliiryhmällä voidaan suojata fosfaatteja. Ryhmän poistaminen tehdään vesiliuoksessa nostamalla lämpötila $90\text{ }^\circ\text{C}$:seen. Suojaryhmä irtoaa syklisaatioreaktiolla ja reaktiossa muodostuu 2-(*tert*-butyyli-imiini)tetrahydrofuraania **66**. Reaktiossa vapautuu protoni, joka laskee reaktioliuoksen pH:ta. Reaktio voidaan tehdä puskuriliuoksessa pH-muutoksen estämiseksi.¹⁴³



Kaavio 44. Reaktiomekanismi 3-(*N*-*tert*-butyylikarboksiamidi)-1-propyyli-ryhmän irrottamisesta. Reaktiossa vapautuu protoni, joten reaktioliuos voi muuttua happamemmaksi.

6.6 Syklisoituvat pyridyylisuojarahmät

Fosfaatti voidaan suojata 3-(2-pyridyyli)-1-propyyli- ja 2-[*N*-metyyli-*N*-(2-pyridyyli)]aminoetyyliryhmällä. Molemmat suojarahmät ovat erittäin labiileja, koska nukleofiilina toimii pyridiinin typpi. Syklisaatioreaktio on hitaampi heikosti happamassa vesiliuoksessa. Reaktiossa muodostuu bisyklisiä pyridiniumkationeja **67** ja **68**.¹⁴⁴

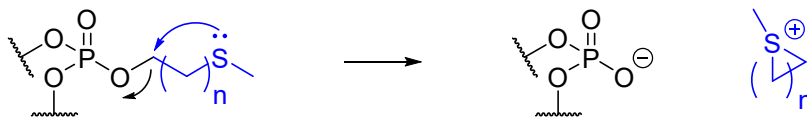


Kaavio 45. Reaktiomekanismi pyridyylisuojarahmien irtoamisesta. 3-(2-pyridyyli)-1-propyyli-ssä X on CH₂ ja muodostaa **67**:n. 2-[*N*-metyyli-*N*-(2-pyridyyli)]aminoetyyli-ssä X on NMe ja muodostaa **68**:n.

2-[*N*-metyyli-*N*-(2-pyridyyli)]aminoetyyliryhmä on labiilimpi suojarahmä, koska aminoryhmä voi luovuttaa elektroneja pyridyyli-ryhmälle. Oligonukleotidien kiintokantajasynteesin hapetusvaiheessa fosforamidiittimenetelmässä osa 3-(2-pyridyyli)-1-propyyli-ryhmistä irtoaa ja kaikki 2-[*N*-metyyli-*N*-(2-pyridyyli)]aminoetyyliryhmät irtoavat. 3-(2-pyridyyli)-1-propyyli-ryhmien poistaminen oligonukleotidista kokonaan tehdään ammoniakkin vesiliuoksessa lämmittämällä. Reaktioaika on 30 minuuttia lämpötilassa 55 °C ja 5 minuuttia 90 °C.¹⁴⁴

6.7 Metyylitioalkyyli-ryhmä

Fosfaattien suojaamiseen voidaan käyttää 4-metyylitiobutyyli-ryhmää tai 2-metyylitioetyyli-ryhmää. 2-metyylitioetyyli-ryhmän syklisaatioreaktio on nopeampi kuin 4-metyylitiobutyyli-ryhmän. Oligonukleotidisynteesin hapetusvaiheessa pitää käyttää hapetusreagenssia, joka ei reagoi metyyli-ryhmän kanssa. Esimerkiksi *tert*-butyylihydroperoksidi hapettaa sulfidin sulfoksidiksi. Metyylisulfinyyli-ryhmä ei ole tarpeeksi nukleofiilinen eikä syklisaatioreaktiota tapahdu.¹⁴⁹



Kaavio 46. Reaktiomekanismi metyylitioalkyyli­ryhmän syk­lisaatioreaktiosta. Kaavion reaktiossa n voi olla 1 tai 3.

Suojaryhmät irrotetaan neutraalissa puskuriliuoksessa tai ammoniakin vesiliuoksessa. 4-Metyylitio-1-butyyliryhmä irrotetaan 30 minuutissa neutraalissa puskuriliuoksessa lämpötilassa 55 °C ja reaktio ammoniakin vesiliuoksessa kestää kaksi tuntia lämpötilassa 55 °C. Syklisaatioreaktiossa muodostuu syklisiä sulfoniumyhdisteitä.¹⁴⁹

7. Yhteenveto

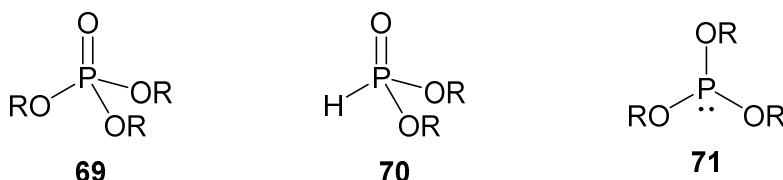
Kirjallisuuskatsauksessa on esitetty lukuisia suojaryhmiä. Seuraavia suojaryhmiä voisi hyödyntää asetaalisuojatun tymidiinivetyfosfonaatin valmistamiseen: *para*-nitrofenetyyli-, fluorenyylimetyyli-, bentsyyli-, 4-okso­pentyyli-, 3-(*N-tert*-butyylikarboksiamidi)-1-propyyli- ja pyridyyli­ryhmä. Edellä mainitut suojaryhmät voisivat lisätä vetyfosfonaattidiesterin lipofiilisyyttä ja auttaa tuotteen eristyksessä.

β -Syanoetyyliryhmän avulla on voitu valmistaa asetaalisuojattu tymidiinivetyfosfonaattimonoesteri. *Para*-nitrofenetyyli- ja fluorenyylimetyyliryhmä ovat β -eliminoituvia suojaryhmiä syanoetyylin tavoin, mutta ne ovat lipofiilisempia, joten uuttautuminen orgaaniseen faasiin olisi tehokkaampaa. Bentsyyli­ryhmän ja polyaromaattisten ryhmien poistaminen valoreaktion avulla voidaan tehdä orgaanisessa liuottimessa. Valoreaktiosta muodostuvat vetyfosfonaattimonoesteri ja aromaattinen tuote ovat polaarisuuksiltaan niin erilaiset, että ne olisi mahdollista erotella. Syklisoituvat suojaryhmät 4-okso­pentyyli-, 3-(*N-tert*-butyylikarboksiamidi)-1-propyyli- ja pyridyyli­ryhmä ovat kokeilemisen arvoisia, mutta niiden poistamisesta orgaanisessa liuottimessa ei ole paljon tietoa. Suojaryhmän poistaminen vedettömissä olosuhteissa on etu, koska voidaan välttyä vetyfosfonaattidiesterin hallitsemattomasta hydrolyysireaktiolta.

Kokeellinen osuus

8. Johdanto

Fosfaatit **69** ja vetyfosfonaatit **70** ovat pentavalenttisia fosforiyhdisteitä, joilla on eri hapetusluvut. Fosfaateilla hapetusluku on V ja vetyfosfonaateilla III. Vetyfosfonaateista ei voida muodostaa pentavalenttisia triestereitä, kuten fosfaateista. Vetyfosfonaatit ja fosfaatit eroavat sekä rakenteeltaan että reaktiivisuudeltaan toisistaan. Vetyfosfonaatilla ei ole neljää happiatomia fosforiin sitoutuneena vaan yksi sidos on H–P-sidos, millä on suuri vaikutus reaktiivisuuteen. Nykyisissä oligonukleotidien synteesimenetelmissä käytetään lähes pelkästään fosfori(III)-yhdisteitä niiden suuremman reaktiivisuuden vuoksi.



Kuva 12. Kuvassa on esitettyä fosfaatin **69**, vetyfosfonaatin **70** ja fosfiitin **71** rakenne. R on H tai alkyyliryhmä.

Vetyfosfonaateissa on vety, jolla on sidos fosforiatomiin. Vetyfosfonaattien fosfori on elektrofiilisempi ja alttiimpi nukleofiilien hyökkäyksille kuin fosfaattien fosfori, vaikka hapetusluku on pienempi. Nukleofiilien on helpompi hyökätä vetyfosfonaatin fosforiin kuin fosfaatin fosforiin, koska hapen tai alkoksiryhmän sijaan steerisenä esteenä on vety. Steeriset tekijät eivät yksinään voi selittää vetyfosfonaatin ja fosfaatin välistä reaktiivisuuseroa.¹⁵⁰ Fosforiyhdisteissä substituenttien elektronien takaisinluovutus on olennainen osa fosforin kemiallisten sidosten luonnetta.¹⁵¹ Fosforiin sitoutunut vety osaltaan selittää vetyfosfonaattien elektrofiilisyyttä verrattuna muihin pentavalenttisiin fosforiyhdisteisiin. Vetyatomilla ei ole vapaita elektronipareja, jotka voisivat siirtää elektronitiheyttä fosforiatomiin tai vetyatomiin ei voi kiinnittyä muita substituentteja, jotka voisivat muun vuorovaikutuksen kautta siirtää elektronitiheyttä fosforille.¹⁵⁰

Vetyfosfonaatit voivat esiintyä toisena tautomeerimuotona, fosfiitteina **71**. Liuoksessa mono- ja diestereiden tautomeerien tasapaino on pentavalenttisessa vetyfosfonaattimuodoissa.¹⁵² Fosfiittitriesterit eivät voi esiintyä vetyfosfonaatteina. Fosfiitin fosfori voi fosfiinin fosforin

tapaan toimia nukleofiilisenä keskuksena reaktioissa, koska fosforiatomilla on vapaa elektronipari.

Vetyfosfonaatteja voidaan pitää fosforihapokkeen johdannaisina. Fosforihapoke on vahva diproottinen happo ja esiintyy liuksissa todennäköisesti anionina. Kaikki vetyfosfonaattimonoesterit ovat fosforihapokkeen tavoin happoja ja voivat esiintyä liuoksessa anioneina, mutta niiden happamuus vaihtelee substituentin mukaan. Vetyfosfonaattidiesterit ovat neutraaleja eivätkä ole happamia, koska fosforissa kiinni oleva vety pitää deprotonoida fosfiittitautomeerin kautta. Vetyfosfonaattidiesterit ovat kiraalisia, jos fosforiin kiinnittyneet substituentit ovat erilaisia. Vetyfosfonaattimonoesterit ovat siten prokiraalisia yhdisteitä.

Vetyfosfonaattiesterit voivat reagoida monella tapaa. Fosfonaatin substituentit, jotka ovat fosfoesterisidoksella kiinni, voidaan poistaa hydrolyyttisesti. Mekanistisesti saman kaltainen on transesteröinti, jolla voidaan vaihtaa vetyfosfonaattiesterin substituentteja. Fosforihapokkeen ja vetyfosfonaattimonoesterin vahvan hapon luonteen vuoksi mono- ja diestereiden alkyylisubstituentteja voidaan dealkyloida hyvinkin vaihtelevilla nukleofiileillä. Vetyfosfonaattiin saadaan liitettyä uusi substituentti esteröimällä. Vaihtoehtoisesti vetyfosfonaatti voidaan ensin aktivoida, usein seka-anhydridiksi, minkä jälkeen substituentin lisäys on helpompaa. Vetyfosfonaatin OH-ryhmä voi reagoida myös nukleofiilinä, mutta yleensä se vaatii hyvin elektrofiilisiä reagensseja tai vaihtoehtoisesti voidaan käyttää Mitsunobu-reaktiota. Fosfiittitriestereitä saadaan muodostettua vetyfosfonaattidiestereistä käyttämällä hyvin elektrofiilisiä reagensseja. Vetyfosfonaattidiesterit voivat fosfiittitautomeerissä reagoida sen vapaalla elektroniparilla ja muodostaa erilaisia fosfonaatteja, kuten jodi-, tio- tai alkyylifosfonaatteja. Vetyfosfonaattien hapettaminen halogeeneilla tapahtuu usein fosfiittitautomeerin kautta.

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää vetyfosfonaattimonomeerien valmistaminen 2-alkoksiopropanyylisuojaetuista nukleosideista difenyylivetyfosfonaatilla. Perinteisesti tymidiini valitaan testiyhdisteeksi, kun kehitetään uusia kemiallisia menetelmiä nukleiinihappokemiaan. Asetaalisuojattujen nukleosidien tapauksessa tymidiini ei kuitenkaan ole helpoin fosfityloitava nukleosidi, koska sen liukoisuusominaisuudet aiheuttavat yhdessä varsin pienikokoisten ja heikosti lipofiilisten asetaalisuojien kanssa haasteita.

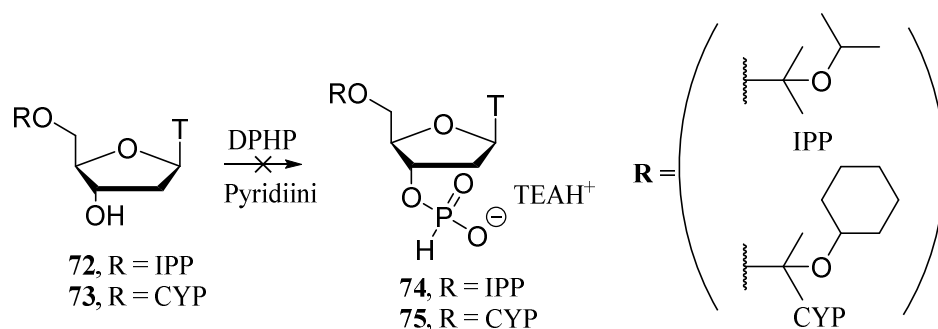
Vetyfosfonaattimonoesterit ovat liuoksissa happamia ja fosfonaatti on usein negatiivisesti varautunut. Asetaalisuojattu tymidiinivetyfosfonaatti osoittautui hyvin vesiliukoiseksi, eikä sen eristäminen onnistunut. Ongelman ratkaisuksi kehitettiin menetelmä, jossa muodostettiin ensin tymidiinin vetyfosfonaattidiesteri syanoetanolin kanssa. Syanoetyyliryhmä toimii suojaryhmänä, joka tekee molekyylistä poolittomamman. Suojattu vetyfosfonaattidiesteri pitäisi olla poolittamampi, koska se ei ole enää ioninen ja siihen on lisätty hiiliketju. Suojaryhmän avulla tymidiinivetyfosfonaatti voitaisiin eristää, jonka jälkeen ryhmä poistetaan emäksellä β -eliminaatioreaktiossa.

Vaihtoehtoisesti tymidiinin liukoisuusominaisuuksia muokattiin suojaamalla tyminin 4-O β -eliminoituvalla poolittomalla suojaryhmällä. Fosfitylointimenetelmä ei tarvitsisi muokkausta jos, emäsmuokattu tymidiini osoittautuu veteen liukenemattomaksi.

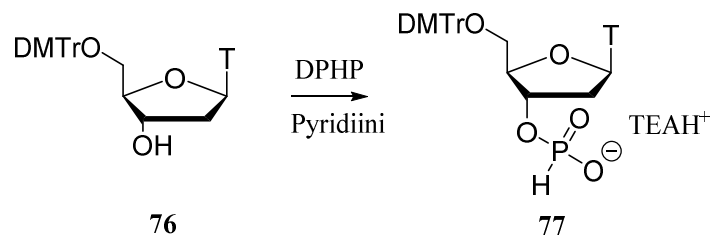
9. Tulokset ja tulosten tarkastelu

9.1 5'-O-alkoksi-isopropyylisuojatun tymidiinin fosfitylointi difenyylivetyfosfonaatilla (DPHP)

Asetaali- **72**, **73** ja DMTr-suojatut tymidiinit **76** fosfityloitiin difenyylivetyfosfonaatilla. Menetelmä toimii julkaisun mukaan DMTr-suojatuilla nukleosideilla.¹⁵³ Reaktiota pystytään seuraamaan ^{31}P -NMR:llä ja sen mukaan fosfitylointi onnistui sekä yhdisteillä **72**, **73** että **76**. Asetaalisuojattujen tuotteiden eristäminen oli kuitenkin ongelmallista, koska ne uuttautuvat veteen. Veteen uuttautuminen todettiin vesifaasin ^{31}P -NMR-näytteestä. DMTr:llä uutto ei tuottanut ongelmaa ja tuotetta **77** saatiin eristettyä.



Kaavio 47. IPP = 2-isopropoksi-2-propyyli, CYP = 2-sykloheksoksi-2-propyyli. TEAH⁺ on trietyyliammoniumioni. Reaktiot tehtiin huoneenlämmössä.

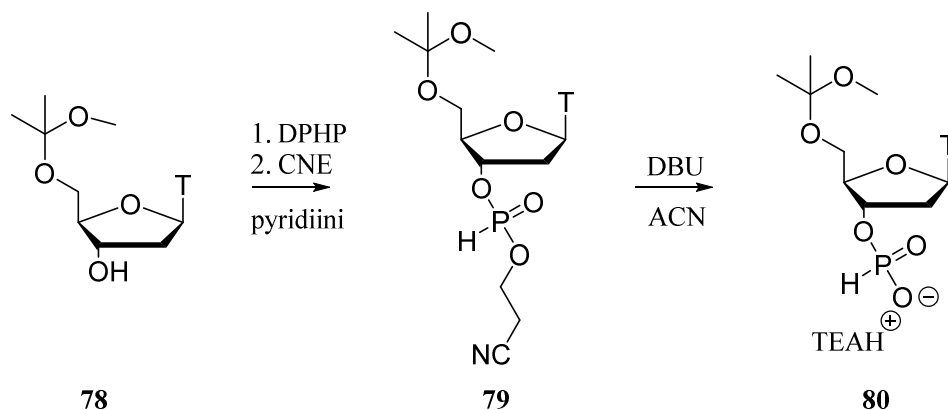


Kaavio 48. DMTr = dimetoksitrityyli. TEAH^+ on trietyyliammoniumioni. Reaktiot tehtiin huoneenlämmössä.

9.2 5'-*O*-metoksi-isopropyylylitymidiinin 3'-*O*-vetyfosfonaatin **80** valmistaminen suojaamalla vetyfosfonaatti syanoetanolilla.

Vetyfosfonaatin muodostuksessa DPHP reagenssilla muodostuu ensin fenolin ja tymidiinin vetyfosfonaattidiestereitä. Fenoli voidaan transesteröimällä vaihtaa toiseen alkoholiin. Tähän tarkoitukseen valitsimme syanoetanolin. Syanoetanolia on käytetty suojaryhmänä amidiitti-⁶, fosfotriesteri-¹⁴ ja vetyfosfonaattimenetelmissä⁸⁵, koska se on inertti DNA-synteesin eri vaiheissa käytetyille reagensseille ja olosuhteille, mutta se voidaan poistaa selektiivisesti emäskäsittelyllä. NMR-testeillä etsittiin parhaat reaktioajat sekä lähtöaineen **78** ja reagenssien suhde ja tuloksia käytettiin koereaktioissa. Syanoetanolisuojatut vetyfosfonaatit pystyttiin uuttamaan orgaaniseen liuottimeen, mutta tuote ei kestänyt silikapylväskromatografiaa.

Syanoetanolia voitiin käyttää kuitenkin väliaikaisena suojaryhmänä uuton aikana ja poistaa sen jälkeen DBU emäskäsittelyllä β -eliminaatiolla. Tymidiinivetyfosfonaattimonoesterin **80** vastaioniksi vaihdettiin trietyyliammoniumioni (TEAH^+) ioninvaihtohartsilla. Tuloksena saatiin MIP-suojattu tymidiinivetyfosfonaatti, jossa ei havaittu olevan sivutuotteita.



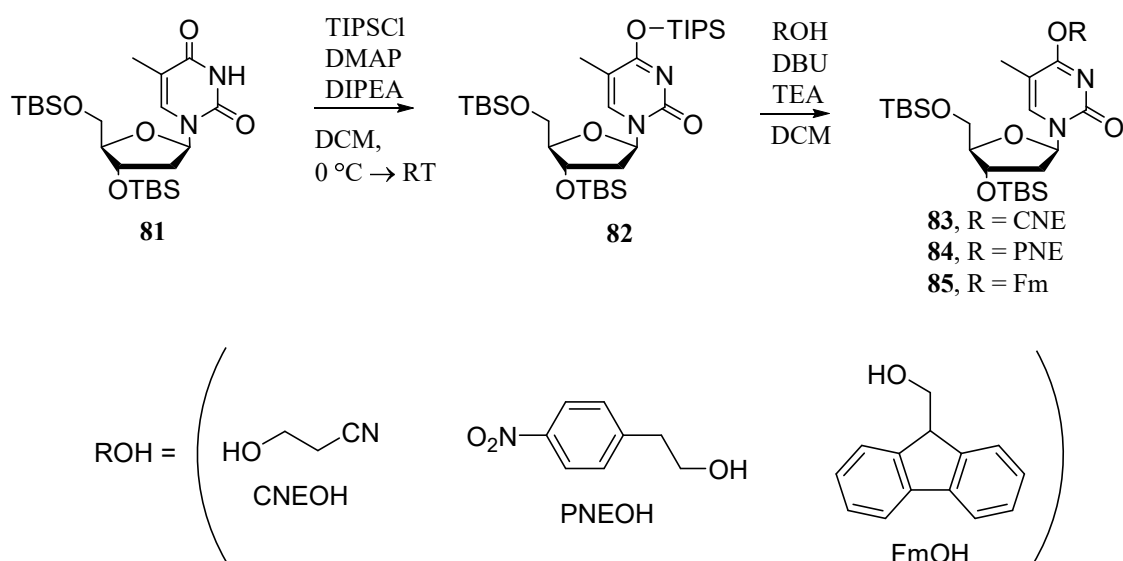
Kaavio 49. MIP-suojatun tymidiinin fosfitylointi käyttäen väliaikaista CNE-fosfaattisuojausta. Reaktiot tehtiin huoneenlämmössä.

Suojatun vetyfosfonaattidiesterin valmistuksessa voitaisiin lisätä nukleosidi hitaasti DPHP:iin ja näin mahdollisesti vähentää diestereiden muodostumista. Syanoetyylin poistamisessa DBU:n lisäystä pitäisi seurata syanoetyylin eliminaation varmistamiseksi, sillä havaitsimme reaktion jääneen osittain kesken.

9.3 Tymidiinin vesiliukoisuuden heikentäminen lipofiilisella suojaryhmällä

Fosfityloinnin suurin haaste on fosfityloidun tymidiinin vesiliukoisuus. Vetyfosfonaattidiesterien vaihtoehtona voisi olla nukleosidin lipofiilisyyden lisääminen sopivalla emäsuojalla. Tymidiinin 4-O voidaan aktivoida ja substituoida lipofiilisellä nukleofiilillä. Suojaryhmiksi valittiin β -eliminoituvat alkoholit, koska ne ovat ortogonaalisia suojaryhmiä verrattuna happolabiileihin asetaalisuojaryhmiin.

3',5'-O-Bis-*tert*-butyylidimetyylisilylyltymidiinin **81** 4-O aktivoitiin 2,4,6-triisopropyyli-fenyyli-sulfonyykloridilla (TIPSCl). Substituutiota aktivoituun tymiiniin kokeiltiin *para*-nitrofenyylietanolla (PNEOH), fluorenyylimetanolla (FmOH) ja syanoetanolla (CNEOH). Alkoholeista tehtiin parempia nukleofiileja deprotonoimalla ne DBU:lla.



Kaavio 50. Suojatun tymidiinin emäsosa aktivoitiin ensin TIPSCl:lla ja sitten suojattiin β -eliminoituvalla lipofiilisella suojaryhmällä. Tymidiinin aktivoinnissa reagenssit lisättiin vesi-jäähauteessa ja lämpötilan annettiin nousta huoneenlämpöön. Substituutio tehtiin huoneenlämmössä.

Sekä aktivoinnin että substituution kohdalla olisi voinut käyttää poolittomampaa eluenttia TLC:hen ja silikapylväskromatografiaan. TLC:ssä näkyi yksi täplä liuosrintamalla käytetyillä poolisilla eluenteilla. Kyseinen täplä erottuu moneksi komponentiksi, jos käytettäisiin

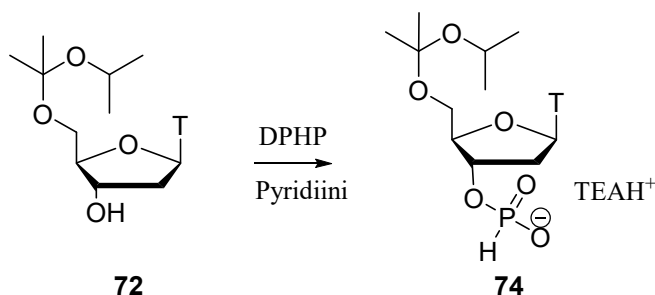
poolittamampaa eluenttia. Erottamattoman ja alkoholien täplien tulkitseminen virheellisesti TLC:ssä johti väärin fraktioiden keräämiseen puhdistuksissa. Emässuojattua tymidiiniä ei saatu valmistettua.

10. Menetelmät

Reaktioissa käytetyt lasiastiat kuivattiin uunissa (250 °C) yön yli. Reaktioissa käytetyt liuottimet olivat kuivia tai niitä säilytettiin molekyyliseulojen kanssa. Kiinteät lähtöaineet ja reagenssit kuivattiin vakuuminlinjassa yön yli ennen käyttöä. Käytetty CNE tislattiin ennen käyttöä ja säilytettiin molekyyliseulojen kanssa. Vetyfosfonaatin valmistamisessa käytettiin TLC eluentteina 10 % MeOH 0,1 % TEA kloroformiliuosta tai 10 % *i*-PrOH 2,5 % TEA etyyliasetaattiliuosta. Tymidiinin 4-*O*-suojauksessa käytettiin TLC:n eluenttina 1:3 EtOAc:n-Hex. TLC-levyjä havainnoitiin 254 nm UV-valossa. NMR -spektrit mitattiin Bruker Avance spektrometreillä (400 MHz ja 500 MHz). Kemialliset siirtymät δ annetaan ppm:nä ja referenssinä käytettiin liuotinpiikkejä.

10.1 Tymidiinin 3'-vetyfosfonaattimonoesterin valmistaminen

5'-*O*-isopropoksi-isopropyylytymidiini 3'-vetyfosfonaattimonoesteri **74**

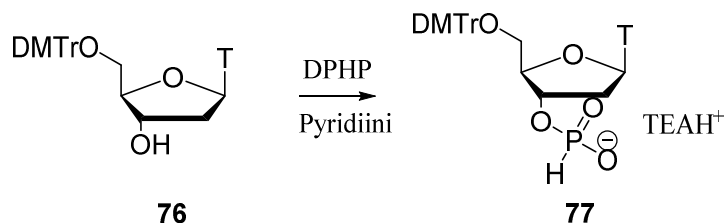


Lähtöaine **72** (0,100 g; 0,292 mmol) liuotettiin 15 ml:n pyridiiniin. Seos haihdutettiin kolmasosaan veden poistamiseksi atseotrooppisesti. Liuosta sekoitettiin ja lisättiin 7 ekv. DPHP:a. Reaktioseoksesta otettiin näyte TLC:a varten 15 minuutin kohdalla. Reaktio lopetettiin 23 minuutin kohdalla lisäämällä 1 ml H₂O ja 1 ml TEA. Seosta haihdutettiin pyöröhaihduttimella ja sitten uutettiin. Seos laimennettiin ensin 20 ml:lla DCM:lla ja uutettiin 3 x 10 ml NaHCO₃. Vesifaasi takaisin uutettiin 10 ml:lla DCM. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografialla siten, että silikamateriaali pakattiin 20 ml:n ruiskuun. Eluenttina käytettiin 0,5 % TEA / DCM. Eluentin polarisuutta nostettiin lisäämällä 1 % MeOH, joka 10

ml, aina 10 % metanoliin asti. Tuotetta **74** ei pystytty varmuudella identifioimaan ja sitä eristettiin 13 mg (8 %). Suurin osa tuotteesta jäi todennäköisesti uuttojen vesifaaseihin.

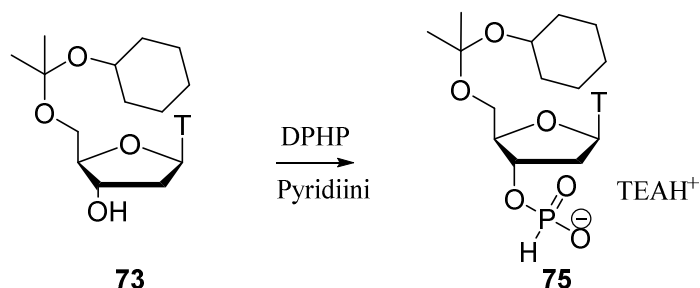
^{31}P -NMR (243 MHz; D_2O): δ 4,90.

5'-O-dimetoksitritiylitymidiini 3'-vetyfosfonaattimonoesteri **77**



Lähtöaine **76** (0,236 g; 0,433 mmol) liuotettiin 20 ml:n pyridiiniin. Seos haihdutettiin kolmasosaan veden poistamiseksi atseotrooppisesti. Liuosta sekoitettiin ja lisättiin 7 ekv. DPHP:a (0,581 ml; 3,03 mmol). Reaktioseoksesta otettiin näyte TLC:a varten 15 minuutin kohdalla. Reaktio lopetettiin 23 minuutin kohdalla lisäämällä 1 ml H_2O ja 1 ml TEA. Otettiin näyte TLC:a varten 15 minuuttia reaktion lopettamisen jälkeen. Seos laimennettiin 30 ml:lla DCM:lla ja uutettiin 3 x 10 ml NaHCO_3 . Vesifaasi takaisin uutettiin 10 ml:lla DCM. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Öljymäinen haihdutusjäännös puhdistettiin silikapylväskromatografialla siten, että silikamateriaali pakattiin 20 ml:n ruiskuun. Eluentina käytettiin 1 % TEA / DCM. Eluentin polaarisuutta nostettiin lisäämällä 1 % MeOH, joka 20 ml, aina 10 % metanoliin asti. Liuottimia sisältävää tuotetta **77** saatiin 0,363 g (118 %).

5'-O-sykloheksoksi-isopropyylyitymidiini 3'-vetyfosfonaattimonoesteri **75**



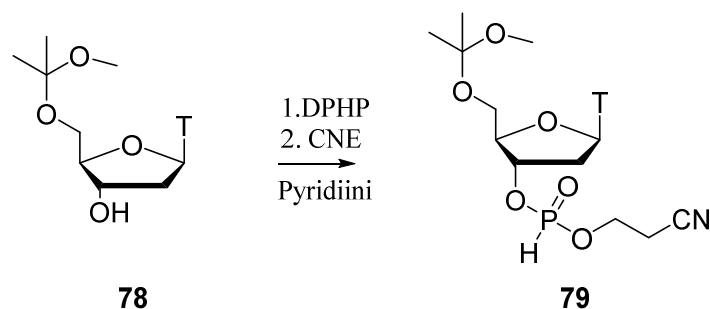
Lähtöaine **73** (0,112 g; 0,293 mmol) liuotettiin 20 ml:n pyridiiniin. Seos haihdutettiin kolmasosaan veden poistamiseksi atseotrooppisesti. Liuosta sekoitettiin ja lisättiin 7 ekv.

DPHP:a (0,4 ml; 2,05 mmol). Reaktioseoksesta otettiin näyte TLC:a varten 15 minuutin kohdalla. Reaktio lopetettiin 23 minuutin kohdalla lisäämällä 1 ml H₂O ja 1 ml TEA. Otettiin näyte TLC:a varten 15 minuuttia reaktion lopettamisen jälkeen. Seos laimennettiin 30 ml:lla DCM:lla ja uutettiin 3 x 10 ml NaHCO₃. Vesifaasi takaisin uutettiin 10 ml:lla DCM. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Öljymäinen haihdutusjäännös puhdistettiin silikapylvaskromatografialla siten, että silikamateriaali pakattiin 20 ml:n ruiskuun. Eluentina käytettiin 1 % TEA / DCM. Eluentin polarisuutta nostettiin lisäämällä 1 % MeOH, joka 20 ml, aina 10 % metanoliin asti. Tuotefraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin. Liuottimia sisältävää tuotetta **75** saatiin 60,6 mg (38 %).

³¹P-NMR (243 MHz; D₂O): δ 5,03.

³¹P-NMR (243 MHz; DMSO-*d*₆): δ 1,24.

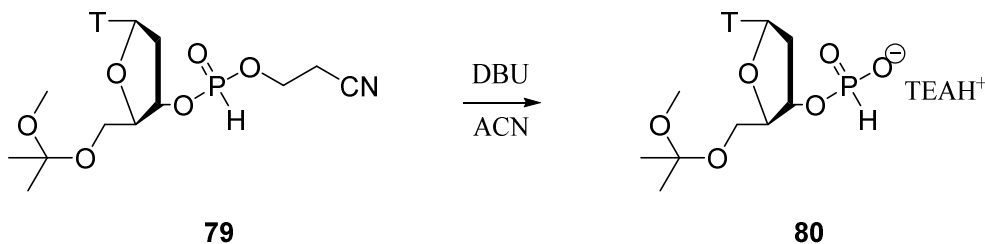
5'-*O*-metoksi-isopropyylylitymidiini 3'-syanoetyylivetyfosfonaattidiesteri **79**



Lähtöaine **78** (0,319 g; 1,01 mmol) liuotettiin 6 ml:n pyridiiniä. Liuosta sekoitettiin ja lisättiin 2,0 ekv. reagenssia DPHP:a (0,39 ml; 2,02 mmol). Reagenssilisäyksestä 10 minuuttia lisättiin 3,0 ekv. CNE (0,21 ml; 3,03 mmol). Sekoitusta jatkettiin ja tunti CNE:n lisäyksestä otettiin näyte ³¹P-NMR-kokeita varten. Reaktioseos laimennettiin 20 ml:lla DCM ja uutettiin 3 x 10 ml NaHCO₃:lla. Vesifaasi takaisin uutettiin 10 ml:lla DCM. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin, haihdutettiin öljymäiseksi ja kuivattiin lopuksi vakuumilinjastossa. Raakatuotteen puhdistus silikapylvaskromatografialla ei onnistunut.

³¹P-NMR (162 MHz; DMSO-*d*₆): δ 8,39.

5'-*O*-metoksi-isopropyylylitymidiini 3'-vetyfosfonaatti **79**

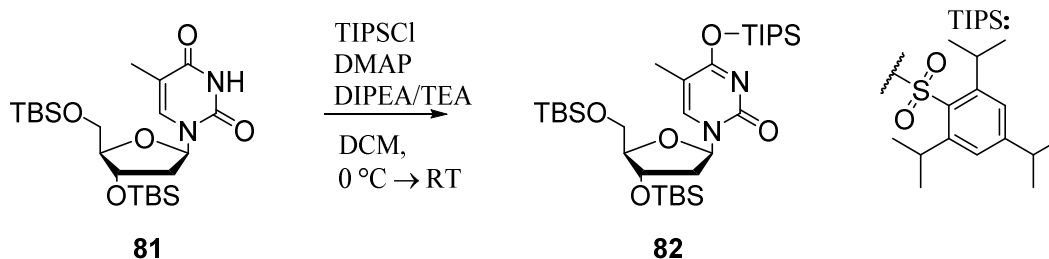


Lähtöaineena käytettiin öljymäistä raakatuotetta **79** ja oletettiin, että puolet massasta oli lähtöainetta. Punnittiin öljymäistä raakatuotetta **79** 0,508 g (0,254 g; 0,589 mmol). Valmistettiin 10 ml:a ACN-liuos, joka sisälsi 1,4 mmol DBU:a. Lähtöaineeseen lisättiin 5 ml (1,2 ekv; 0,7 mmol) DBU-ACN-liuosta ja sekoitettiin 15 min. Reaktio lopetettiin sekoittamalla se DOWEX 50W kationinvaihtajahartsiin, johon oli vaihdettu kationiksi trietyyliammoniumioni, TEAH⁺. Hartsiseosta sekoitettiin ja eluoitiin ACN:llä. Liuottimet haihdutettiin pyöröhaihduksella. Puhdistettiin silikapylväskromatografiolla eluentina 5 % TEA, 20 % *i*-PrOH ja DCM. Tuotetta **80** ei saatu puhdistettua vaan tuotefraktio sisälsi myös bisnukleosidivetyfosfonaatteja.

³¹P-NMR (162 MHz; DMSO-*d*₆): δ -0,51.

10.2 Tymidiinin 4-*O* suojaaminen β-eliminoituvalla suojaryhmällä

3',5'-*O*-Bis-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-4-*O*-(2,4,6-tri-isopropyylylfenyyli)sulfonyyli)tymidiini **82**

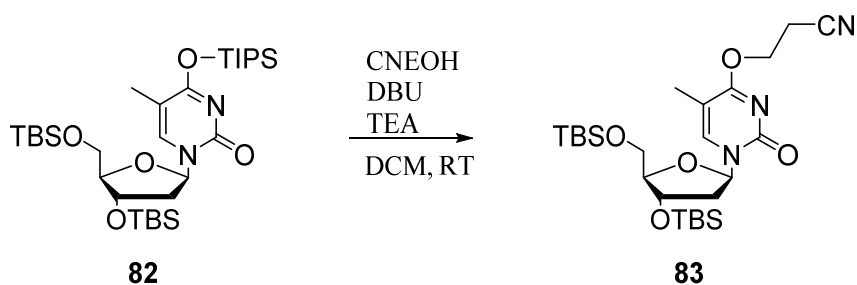


Lähtöaine **81** (1,01 g; 2,12 mmol) liuotettiin 5 ekv. DIPEA (1,85 ml; 10,6 mmol) ja 10 ml:n DCM ja sekoitettiin vesi-jäähäuteessa. Reagenssi 1,8 ekv. TIPSCl (1,16 g; 3,82 mmol) liuotettiin 5 ml:n DCM. Katalyytti DMAP 0,1 ekv. liuotettiin 5 ml:n DCM. Kylmään reaktioastiaan lisättiin ensin reagenssi sitten katalyytti. TLC-näyte 10 minuuttia reagenssin lisäyksestä näytti, että tuotetta muodostui, joten reaktiokolvi siirrettiin huoneenlämpöön. Reaktiota sekoitettiin yön yli. Reaktioseos laimennettiin 50 ml:lla DCM ja uutettiin 3 x 30

ml:lla NaHCO₃ ja 30 ml:lla NaCl. Vesifaasi takaisinuuutettiin 2 x 30 ml:lla DCM. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografialla käyttäen eluenttina 0,1 % TEA 1:3 EtOAc:n-Hex. EtOAc:n osuutta nostettiin ajon aikana. Tuotefraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin. Tuote **82** ei ollut täysin puhdasta vaan sisälsi 2,4,6-tri-isopropyyli-fenyylisulfonyyli-happoa. Saanto oli 1,287 g (82 %).

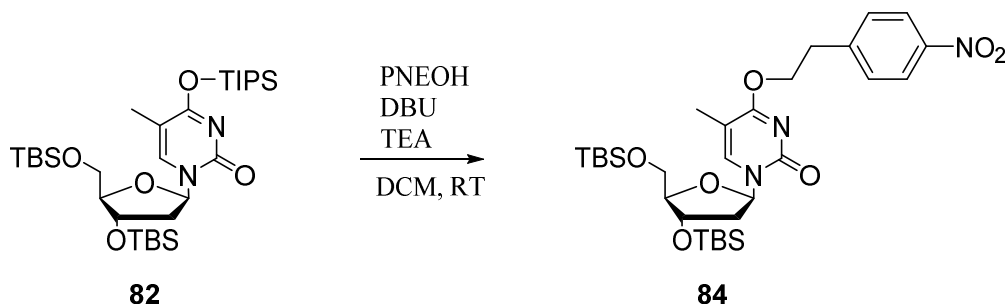
¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 7,22 (s, 1H, 6); 7,19 (s, 2H, TIPS-ArH₂); 6,12 (t, 1H, 1'); 4,31 (m, 1H, 3'); 4,23 (m, 1H, *p*-ArCH); 3,96 (m, 1H, 4'); 3,89 & 3,74 (m, 2H, 5'); 2,91 (m, 2H, *o*-ArCH); 2,48 & 1,96 (m, 2H, 2'); 2,03 (m, 3H, 5-Me); 1,31 (m, 12H, *o*-iPr); 1,26 (m, 6H, *p*-iPr); 0,89 (m, 9H, Si-*t*-Bu); 0,86 (m, 9H, Si-*t*-Bu); 0,093 & 0,080 (m, 6H, Si-Me); 0,044 & 0,041 (m, 6H, Si-Me)

3',5'-*O*-Bis-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-4-*O*-(2-syanoetyyli)-tymidiini **83**



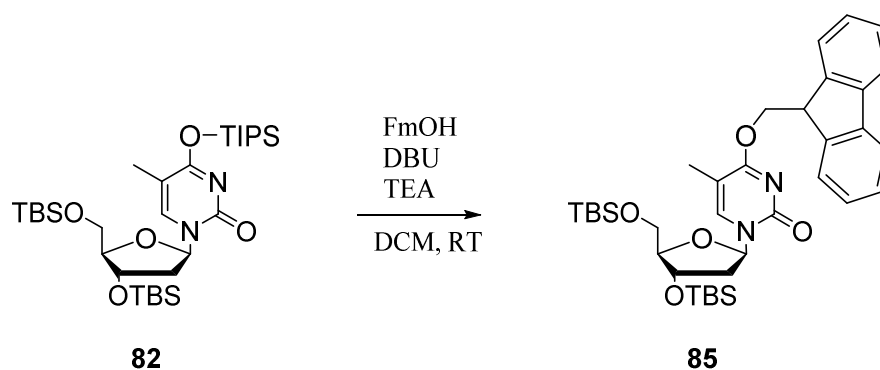
Lähtöaineeseen **82** (0,774 g; 1,05 mmol) lisättiin 1 ekv. CNEOH (72 µl; 1,05 mmol), 1,7 ekv. TEA (0,25 ml; 1,79 mmol) ja 5 ml DCM. Reaktioseosta sekoitettiin ja lisättiin 1 ekv. DBU (0,157 ml; 1,05 mmol). Sekoitettiin yön yli. Tuotetta **83** ei havaittu.

3',5'-*O*-Bis-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-4-*O*-(4-nitrofenetyyli)-tymidiini **84**



Lähtöaineeseen **82** (0,774 g; 1,05 mmol) lisättiin 1 ekv. PNEOH (0,176 g; 1,05 mmol), 1,7 ekv. TEA (0,25 ml; 1,79 mmol) ja 5 ml DCM. Reaktioseosta sekoitettiin ja lisättiin 1 ekv. DBU (0,157 ml; 1,05 mmol). Sekoitettiin yön yli. Tuotetta **84** ei havaittu.

3',5'-O-Bis-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-4-O-(fluorenyylimetyyli)-tymidiini 85



Lähtöaineeseen **82** (0,774 g; 1,05 mmol) lisättiin 1 ekv. FmOH (0,206 g; 1,05 mmol), 1,7 ekv. TEA (0,25 ml; 1,79 mmol) ja 5 ml DCM. Reaktioseosta sekoitettiin ja lisättiin 1 ekv. DBU (0,157 ml; 1,05 mmol). Sekoitettiin yön yli. Tuotetta **85** ei havaittu.

Lähdeluettelo

1. Z. Liang, H. Koivikko, M. Oivanen and P. Heinonen, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2019, **15**, 746–751.
2. K. K. Ogilvie, N. Y. Theriault, J.-M. Seifert, R. T. Pon and M. J. Nemer, *Can. J. Chem.*, 1980, **58**, 2686–2693.
3. G. W. Daub and E. E. Van Tamelen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 3526–3528.
4. M. D. M. Gray and D. J. H. Smith, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 859–860.
5. D. E. Bryant, C. Kilner and T. P. Kee, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 614–616.
6. N. D. Sinha, J. Biernat and H. Köster, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5843–5846.
7. C. Claesen, G. I. Tesser, C. E. Dreef, J. E. Marugg, G. A. van der Marel and J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 1307–1310.
8. D. J. H. Smith, K. K. Ogilvie and M. F. Gillen, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 861–864.
9. L. J. McBride and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 245–248.
10. A. Andrus and S. L. Beaucage, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 5479–5482.
11. N. Usman, K. K. Ogilvie, M. Y. Jiang and R. J. Cedergren, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 7845–7854.
12. J. Vepsäläinen, H. Nupponen and E. Pohjala, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 4551–4554.
13. F. Eckstein and I. Rizk, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1967, **6**, 695–696.
14. J. C. Catlin and F. Cramer, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 245–250.
15. E. LeGoff, *J. Org. Chem.*, 1964, **29**, 2048–2050.
16. T. Neilson, *J. Chem. Soc. D*, 1969, 1139–1140.
17. T. Neilson and E. S. Werstiuk, *Can. J. Chem.*, 1971, **49**, 3004–3011.
18. J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegaal and G. Wille, *Nucleic Acids Res.*, 1977, **4**, 1047–1063.
19. K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage and D. W. Entwistle, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **17**, 1255–1256.
20. K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman and S. A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 7327–7332.
21. R. L. Letsinger, E. P. Groody and T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 6805–6806.
22. Y. Tanigawa, K. Nishimura, A. Kawasaki and S.-I. Murahashi, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 5549–5552.
23. Y. Hayakawa, H. Kato, M. Uchiyama, H. Kajino and R. Noyori, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 2400–2402.
24. Y. Hayakawa, M. Uchiyama, T. H. Kato and R. Noyori, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 6505–6508.
25. A. Sakakura and Y. Hayakawa, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 4427–4435.
26. Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1691–1696.
27. R. Noyori, M. Uchiyama, H. Kato, S. Wakabayashi and Y. Hayakawa, *Pure Appl. Chem.*, 1990, **62**, 613–622.
28. Y. Hayakawa, *BCSJ*, 2001, **74**, 1547–1565.
29. E. Kuyl-Yeheskiely, C. M. Tromp, A. W. M. Lefebber, G. A. van der Marel and J. H. van Boom, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 6515–6523.
30. M. Manoharan, Y. Lu, M. D. Casper and G. Just, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 243–246.
31. Y. Hayakawa, M. Hirose and R. Noyori, *Nucleosides Nucleotides*, 1989, **8**, 867–870.
32. Y. Hayakawa and M. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12395–12401.

33. S. Tanaka, Y. Suzuki, H. Saburi and M. Kitamura, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 6559–6568.
34. A. M. Michelson and A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1955, 2632–2638.
35. K. H. Scheit, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 3243–3247.
36. M. M. Sim, H. Kondo and C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 2260–2267.
37. A. H. Krotz, D. L. Cole and V. T. Ravikumar, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 1999–2002.
38. A. Sawabe, S. A. Filla and S. Masamune, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 7685–7686.
39. S. Honda and T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 2093–2096.
40. V. T. Ravikumar, H. Sasmor and D. L. Cole, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 2637–2640.
41. V. T. Ravikumar, T. K. Wyrzykiewicz and D. L. Cole, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 9255–9266.
42. V. T. Ravikumar, *Synth. Commun.*, 1995, **25**, 2161–2164.
43. J. E. Celebuski, C. Chan and R. A. Jones, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5535–5538.
44. A. H. Krotz, P. Wheeler and V. T. Ravikumar, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 2406–2409.
45. T. Wada and M. Sekine, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 757–760.
46. S. F. Martin, J. A. Josey, Y.-L. Wong and D. W. Dean, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 4805–4820.
47. F. Ferreira, J.-J. Vasseur and F. Morvan, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6287–6290.
48. K. C. Ross, D. L. Rathbone, W. Thomson and S. Freeman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1995, 421–426.
49. T. Guerlavais-Dagland, A. Meyer, J.-L. Imbach and F. Morvan, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, **2003**, 2327–2335.
50. C. B. Reese and R. Saffhill, *Chem. Commun. (London)*, 1968, 767–768.
51. J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, P. H. van Deursen, R. Arentzen and C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 1974, **15**, 3785–3788.
52. N. J. Cusack, C. B. Reese and J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, 1973, **14**, 2209–2212.
53. K. Itakura, C. P. Bahl, N. Katagiri, J. J. Michniewicz, R. H. Wightman and S. A. Narang, *Can. J. Chem.*, 1973, **51**, 3649–3651.
54. R. L. Letsinger and W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 3655–3661.
55. K. Itakura, N. Katagiri and S. A. Narang, *Can. J. Chem.*, 1974, **52**, 3689–3693.
56. J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese and R. Saffhill, *J. Chem. Soc. D*, 1971, 869–871.
57. J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, C. P. Bahl and R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, 1977, **4**, 353–371.
58. G. R. Gough, C. K. Singleton, H. L. Weith and P. T. Gilham, *Nucleic Acids Res.*, 1979, **6**, 1557–1570.
59. C. B. Reese and L. Yau, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **19**, 4443–4446.
60. R. Belagaje and C. K. Brush, *Nucleic Acids Res.*, 1982, **10**, 6295–6303.
61. R. Charubala and W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 1933–1936.
62. C. B. Reese, R. C. Titmas and L. Yau, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **19**, 2727–2730.
63. E. Uhlmann and W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 1181–1184.
64. C. B. Reese and L. Zard, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 4611–4626.
65. M. Sekine, J.-I. Matsuzaki and T. hata, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 5279–5288.
66. C. B. Reese and Q. Song, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 2787–2792.
67. C. B. Reese and Q. Song, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 2027–2031.
68. C. B. Reese and Q. Song, *Nucleosides Nucleotides*, 1999, **18**, 1175–1180.
69. M. Sekine and T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**, 1711–1714.
70. C. T. J. Wreesmann, A. Fidler, G. H. Veeneman, G. A. van der Marel and J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 933–936.

71. C. E. Dreef, C. M. Dreef-Tromp, G. A. van der Marel and J. H. van Boom, *Synlett*, 1990, **8**, 481–483.
72. T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Urakami, K. Koura, M. Sekine, K. Shinozaki, K. Miura and T. Hata, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 4552–4557.
73. A. Wilk, A. Grajkowski, L. R. Phillips and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 7515–7522.
74. H. Tsunoda, T. Kudo, A. Ohkubo, K. Seio and M. Sekine, *Molecules*, 2010, **15**, 7509–7531.
75. T. Umemoto and T. Wada, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 4251–4253.
76. C.-A. Chang and T. Horn, *Nucleosides Nucleotides*, 1999, **18**, 1205–1206.
77. G. M. Tener, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 159–168.
78. R. L. Letsinger and V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 3526–3527.
79. R. L. Letsinger and V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 5319–5324.
80. R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie and P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 3360–3365.
81. R. W. Adamiak, M. Z. Barciszewska, E. Biala, K. Grzésekowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz and M. Wiewiórowski, *Nucleic Acids Res.*, 1976, **3**, 3397–3408.
82. S. A. Scaringe, C. Francklyn and N. Usman, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 5433–5441.
83. A. K. Sood and S. A. Narang, *Nucleic Acids Res.*, 1977, **4**, 2757–2765.
84. H. M. Hsiung, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 5119–5122.
85. T. Szabó, H. Almer, R. Strömberg and J. Stawinski, *Nucleosides Nucleotides*, 1995, **14**, 715–716.
86. F. Himmelsbach, B. S. Schulz, T. Trichtinger, R. Charubala and W. Pfeleiderer, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 59–72.
87. R. Charubala and W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 4789–4792.
88. A. M. Avino and R. Eritja, *Nucleosides Nucleotides*, 1994, **13**, 2059–2069.
89. H. Almer, T. Szabo and J. Stawinski, *Chem. Commun.*, 2004, 290–291.
90. N. Katagiri, C. P. Bahl, K. Itakura, J. Michniewicz and S. A. Narang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1973, 803–804.
91. P. H. Seeberger, E. Yau and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1472–1478.
92. Z.-W. Yang, Z.-S. Xu, N.-Z. Shen and Z.-Q. Fang, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 1995, **1–2**, 167–173.
93. Y. Watanabe, T. Nakamura and H. Mitsumoto, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 7407–7410.
94. Y. Watanabe and M. Nakatomi, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1583–1586.
95. B. G. Lawhorn, S. B. Boga, S. E. Wolkenberg, D. A. Colby, C.-M. Gauss, M. R. Swingle, L. Amable, R. E. Honkanen and D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16720–16732.
96. C. P. Burke, N. Haq and D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 2157–2159.
97. J. Zhu, H. Fu, Y. Jiang and Y. Zhao, *Synlett*, 2005, **12**, 1927–1929.
98. X. Lin, J. Chen, S. Shahsavari, N. Green, D. Goyal and S. Fang, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 3870–3873.
99. B. Halami, S. Shahsavari, Z. Nelson, L. Prehoda, D. N. A. M. Eriyagama and S. Fang, *ChemistrySelect*, 2018, **3**, 8857–8862.
100. S. Shahsavari, D. N. A. M. Eriyagama, J. Chen, B. Halami, Y. Yin, K. Chillar and S. Fang, *J. Org. Chem.*, 2019, **84**, 13374–13383.
101. J. J. Li, *Name Reactions: A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications*, Springer International Publishing, 5th edn., 2014.
102. X. Ding, D. A. Devalankar and P. Wang, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 5396–5399.
103. C. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke and P. Lang, *Liebigs Ann. Chem.*, 1972, **763**, 162–172.
104. J. W. Chamberlin, *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 1658–1660.

105. P. Wang, W. Lu, D. A. Devalankar and Z. Ding, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 2114–2117.
106. R. S. Givens and B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6860–6861.
107. R. S. Givens and L. William. Kueper, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 55–66.
108. J. A. Pincock, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 43–49.
109. X. Ding and P. Wang, *J. Org. Chem.*, 2017, **82**, 7309–7316.
110. X. Ding and P. Wang, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 10736–10742.
111. R. S. Givens and R. Singh, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 7013–7016.
112. V. M. Clark, J. B. Hobbs and D. W. Hutchinson, *J. Chem. Soc. D*, 1970, 339–340.
113. T. Furuta, H. Torigai, M. Sugimoto and M. Iwamura, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 3953–3956.
114. C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2002, 125–142.
115. T. Furuta, Y. Hirayama and M. Iwamura, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1809–1812.
116. P. Wang, *Asian J. Org. Chem.*, 2013, **2**, 452–464.
117. T. V. Abramova, J. P. Leonetti, V. V. Vlassov and B. Lebleu, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2000, **26**, 174–182.
118. Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer and J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 4581–4595.
119. M. Rubinstein, B. Amit and A. Patchornik, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**, 1445–1448.
120. J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray and D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 7170–7177.
121. J. E. Baldwin, A. W. McConnaughie, M. G. Moloney, A. J. Pratt and S. Bo Shin, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6879–6884.
122. M. C. Pirrung and S. W. Shuey, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3890–3897.
123. R. S. Givens, P. S. Athey, B. Matuszewski, L. W. Kueper, J. Xue and T. Fister, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6001–6012.
124. J. E. T. Corrie and D. R. Trentham, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, 2409–2417.
125. C.-H. Park and R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2453–2463.
126. S. N. Senadheera, A. L. Yousef and R. S. Givens, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 2038–2054.
127. K. Zhang, J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe and P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 5625–5632.
128. J. C. Sheehan and K. Umezawa, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 3771–3774.
129. P. Klán, A. P. Pelliccioli, T. Pospíšil and J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002, **1**, 920–923.
130. R. S. Givens and C.-H. Park, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 6259–6262.
131. P. G. Conrad, R. S. Givens, B. Hellrung, C. S. Rajesh, M. Ramseier and J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9346–9347.
132. A. Banerjee and D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 2965–2966.
133. V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter and U. B. Kaupp, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 1045–1048.
134. R. S. Givens, M. Rubina and J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, **11**, 472–488.
135. Y. Zhu, C. M. Pavlos, J. P. Toscano and T. M. Dore, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4267–4276.
136. Y. Zhang, H. Tanimoto, Y. Nishiyama, T. Morimoto and K. Kakiuchi, *Synlett*, 2012, **23**, 367–370.
137. D. M. Brown and G. O. Osborne, *J. Chem. Soc.*, 1957, 2590–2593.
138. D. B. Denney, R. L. Powell, A. Taft and D. Twitchell, *Phosphorus*, 1971, **1**, 151.
139. J. B. Hendrickson and M. S. Hussoin, *Synlett*, 1990, **2**, 423–424.

140. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Sobkowska and A. Kraszewski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1994, 1803–1808.
141. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Sobkowska and A. Kraszewski, *Nucleosides Nucleotides*, 1995, **14**, 839–842.
142. A. Grajkowski, A. Wilk, M. K. Chmielewski, L. R. Phillips and S. L. Beaucage, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1287–1290.
143. A. Wilk, M. K. Chmielewski, A. Grajkowski, L. R. Phillips and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 6430–6438.
144. J. Cieślak and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 10123–10129.
145. A. Wilk, K. Srinivasachar and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6712–6713.
146. A. P. Guzaev and M. Manoharan, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 5623–5626.
147. A. P. Guzaev and M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 783–793.
148. A. Wilk, M. K. Chmielewski, A. Grajkowski, L. R. Phillips and S. L. Beaucage, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5635–5639.
149. J. Cieślak, A. Grajkowski, V. Livengood and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2509–2515.
150. A. Kraszewski and J. Stawinski, *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**, 2217–2227.
151. D. G. Gilheany, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 1339–1374.
152. J. P. Guthrie, *Can. J. Chem.*, 1979, **57**, 236–239.
153. J. Jankowska, M. Sobkowski, J. Stawinski and A. Kraszewski, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 3355–3358.